

JC09 Rec'd PCT/PTO 31 MAY 2003

DOCKET NO.: 272686US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Herve VOLLAND, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR03/03521

INTERNATIONAL FILING DATE: November 28, 2003

FOR: METHOD FOR CONTINUOUS DETECTION OF AN ANALYTE, TRIFUNCTIONAL
DETECTING REAGENT USED AND DETECTING DEVICE**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

COUNTRY
France**APPLICATION NO**
02 14959**DAY/MONTH/YEAR**
28 November 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/FR03/03521. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number
22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT/FR2003/003521

31 MAY 2005

PCT

NOTIFICATION RELATIVE A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

GOULARD, Sophie
CABINET ORES
36, rue de St Petersburg
F-75008 PARIS
FRANCE

CABINET ORES
26. FEV. 2004

Date d'expédition (jour/mois/année) 17 février 2004 (17.02.2004)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire SGF263/86	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale no PCT/FR2003/003521	Date du dépôt international (jour/mois/année) 28 novembre 2003 (28.11.2003)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 28 novembre 2002 (28.11.2002)
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE etc	

1. Par le présent formulaire, qui remplace toute notification antérieure relative à la présentation ou à la transmission de documents de priorité, il est notifié au déposant la date de réception par le Bureau international du ou des documents de priorité concernant toute demande antérieure dont la priorité est revendiquée. Sauf indication contraire consistant en les lettres "NR", figurant dans la colonne de droite, ou un astérisque figurant à côté d'une date de réception, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) or b).
2. (Le cas échéant) Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité qui, à la date d'expédition du présent formulaire, n'a pas encore été reçu par le Bureau international selon la règle 17.1.a) ou b). Lorsque, selon la règle 17.1.a), le document de priorité doit être présenté par le déposant à l'office récepteur ou au Bureau international, mais que le déposant n'a pas présenté le document de priorité dans le délai prescrit par cette règle, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) selon laquelle aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité considérée avant d'avoir donné au déposant la possibilité, à l'ouverture de la phase nationale, de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
3. (Le cas échéant) Un astérisque (*) figurant à côté de la date de réception, dans la colonne de droite, signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b) (le document de priorité a été reçu après le délai prescrit par la règle 17.1.a) ou la demande d'établissement et de transmission du document de priorité a été soumise à l'office récepteur après le délai prescrit par la règle 17.1.b)). Même si le document de priorité n'a pas été remis conformément à la règle 17.1.a) ou b), le Bureau international transmettra une copie du document aux offices désignés, pour leur appréciation. Dans le cas où une telle copie n'est pas acceptée par un office désigné comme document de priorité, la règle 17.1.c) énonce que aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité considérée avant d'avoir donné au déposant la possibilité, à l'ouverture de la phase nationale, de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
28 nove 2002 (28.11.2002)	0214959	FR	11 févr 2004 (11.02.2004)

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé:

Olivia TEFY

n° de télécopieur: (41-22) 338.71.40

n° de téléphone: (41-22) 338 8516

REC'D 11 FEB 2004

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

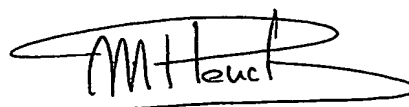
Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 02 DEC. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)



Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 4 5 / 210502

REMISE DE COPIES DATE 28 NOV 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0214959 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 28 NOV. 2002		Réservé à l'INPI <input checked="" type="checkbox"/> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) SGimF263/86 FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<input checked="" type="checkbox"/> NATURE DE LA DEMANDE Demande de brevet Demande de certificat d'utilité Demande divisionnaire <i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date _____ <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> N° _____ Date _____ Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date _____		Cochez l'une des 4 cases suivantes <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/> TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCÉDÉ DE DÉTECTION EN CONTINU D'UN ANALYTE, RÉACTIF TRIFONCTIONNEL DE DÉTECTION MIS EN ŒUVRE ET DISPOSITIF DE DÉTECTION.			
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date _____ N° _____ Pays ou organisation Date _____ N° _____ Pays ou organisation Date _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases) Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Domicile ou siège Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE Etablissement Public 31-33 rue de la Fédération 75015 PARIS N° de télécopie (facultatif) _____ <input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2^{ème} page



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES DATE 28 NOV 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0214959 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom		GOULARD
Prénom		Sophie
Cabinet ou Société		CABINET ORES
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	6, avenue de Messine
	Code postal et ville	75 008 / PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		01 45 62 75 00
N° de télécopie (facultatif)		01 45 62 04 86
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com
7 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'Inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Sophie GOULARD N°02-0503		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI

La présente invention est relative à un procédé de détection en continu en phase hétérogène d'un analyte, au réactif trifonctionnel de détection mis en œuvre au cours de ce procédé, à son utilisation pour la détection d'un analyte, ainsi qu'au dispositif de détection d'un analyte correspondant.

5 Il existe à l'heure actuelle de nombreuses techniques permettant la détection d'analytes, et en particulier de molécules dans des conditions de laboratoire. Cependant de plus en plus fréquemment, pour des raisons de santé et de sécurité notamment, il est nécessaire de détecter rapidement la présence de composés qui sont soit des composés d'intérêt (toxines, toxiques chimiques, hormones,...), soit de
10 produits dérivés ou associés avec des molécules d'intérêt, soit de marqueurs d'un événement ou d'une activité particulière (pesticides, métaux lourds, hormones...).

Ces molécules peuvent être présentes dans des milieux très divers tels que l'eau, l'air, la terre, des échantillons biologiques ou bien encore dans des aliments.

15 Pour une protection et/ou surveillance optimale, la détection de ces molécules doit être effectuée en temps réel et en continu. On entend par dosage en continu un dosage permettant de suivre en permanence la présence ou les modifications de concentration d'une molécule d'intérêt dans un milieu.

Parmi les nombreuses techniques utilisées à ce jour pour détecter ces
20 composés (analytes), un grand nombre utilise la particularité de certaines substances à se lier spécifiquement à ces analytes pour former des complexes. Ces substances que l'on appellera "récepteur", peuvent être de nature très diverse : biologique (anticorps sous forme entière, fragmentaire ou recombinante (Fab', Fab, scFv), récepteurs, acides polynucléiques (ADN ou ARN), acides peptidonucléiques, lectines, protéines
25 transporteuses) ou chimique (chélates, récepteurs synthétiques). Parmi ces substances, l'anticorps présente la plus large utilisation.

De telles méthodes de détection nécessitent un marquage afin de quantifier ou détecter, par un signal, les complexes formés après réaction entre l'analyte à détecter et le récepteur. Ce marquage peut être porté soit par le récepteur
30 soit par une substance (B) correspondant à l'analyte ou à un analogue ou à un fragment de l'analyte ; cette molécule marquée étant souvent appelée traceur.

Suivant que la technique nécessite ou non la séparation des complexes formés des substances libres, on distingue deux grands types de détection dits en phase homogène ou en phase hétérogène.

Les dosages en phase homogène sont réalisés dans un même milieu.
 5 Ils sont utilisés lorsque la formation du complexe modifie le signal porté par le récepteur ou la molécule (B) : la formation du complexe peut alors être suivie directement en mesurant le signal. Ces dosages ne nécessitant pas d'étape de séparation permettent une automatisation plus aisée.

Les dosages en phase hétérogène font intervenir, après réaction entre
 10 l'analyte et le récepteur, une étape de séparation du traceur non complexé de celui engagé dans les complexes. Cette séparation est souvent réalisée en employant deux milieux ou phases : par exemple une phase solide et une phase liquide.

A partir de ces principes de base, de nombreuses méthodes de dosages ont été décrites, différant notamment selon la nature du marquage utilisé qui
 15 peut par exemple être enzymatique, radioactif ou luminescent (Grassi J. *et al*, Handbook of Experimental Pharmacology, Ed. Springer-Verlag, Berlin, 1987, 87, Chapitre 5 ; Pelizzola D. *et al*, Q J Nucl. Med., 1995, 39(4) 251-263).

Parmi ceux-ci, le marquage par un composé luminescent présente l'avantage d'obtenir un signal localisé qui ne nécessite pas la présence d'autres réactifs
 20 comme c'est le cas pour les marquages enzymatiques. Ce type de marquage permet également l'utilisation de phénomène tel que le transfert d'énergie qui peut s'effectuer selon différents mécanismes : transfert d'énergie par résonance, transfert d'énergie radiatif (l'accepteur absorbe la lumière émise par le donneur), transfert d'électron (Matko J. *et al*. Biochemistry, 1992, 31, 703-711 ; Nikoobakht B. *et al*,
 25 Photochemistry and Photobiology, 2002, 75, 591-597).

Ce transfert d'énergie, entre un composé "donneur" (D) luminescent et un composé "accepteur" (A) luminescent ou non, et qui est dépendant de la distance entre A et D, a été utilisé pour la réalisation de nombreux dosages. On choisit D et A, qui sont couplés à l'accepteur ou l'analyte, afin que le transfert d'énergie n'ait lieu que
 30 lorsque le complexe récepteur/analyte est formé. Ce phénomène se traduit par une diminution ou extinction de la luminescence de D et une émission de luminescence de A si celui-ci est luminescent, lorsque D est excité. Lors de ces dosages on mesure soit

la variation de la luminescence de A, soit la variation de la luminescence de D ; la nature de A et de D étant variable.

C'est ainsi que différents Auteurs ont déjà proposé des méthodes de détection d'un analyte par mesure de la luminescence de A :

- 5 - la méthode décrite par exemple par Arai R. *et al.* (Protein Engineering, 2000, 13(5), 369-396) utilise comme donneur et accepteur deux protéines fluorescentes. Ces deux protéines sont produites par biologie moléculaire, chacune formant une protéine chimère avec soit la région variable de la chaîne lourde soit la région variable de la chaîne légère d'un même anticorps. La présence de la
10 molécule contre laquelle est dirigé l'anticorps induit la formation d'un complexe avec les deux protéines chimériques. La distance entre les deux protéines fluorescentes est alors compatible avec un transfert d'énergie, l'excitation de D va donc induire une fluorescence de A qui sera mesurée ;
 - selon la demande internationale WO 96/42016, il est possible
15 d'utiliser comme donneur un complexe de terres rares (europium, terbium) avec un chélate, un cryptate ou un macrocycle et comme accepteur une protéine fluorescente. A et D peuvent être, soit couplés à deux récepteurs pouvant se complexer simultanément sur l'analyte et la présence de ce dernier se traduit alors par une
20 émission de luminescence de A lorsque D est excité, soit A est couplé à un récepteur et D à l'analyte et la présence de l'analyte va induire une compétition avec l'analyte couplé à D pour la complexation avec le récepteur (dosage compétitif), la luminescence de A devenant alors inversement proportionnelle à la quantité de l'analyte ajouté. Ce type de dosage est appelé dosage par luminescence résolue dans le
25 temps.
 D'autres Auteurs ont également proposé des méthodes de détection
d'un analyte par mesure de la luminescence de D. Ces dosages utilisent la capacité
d'un composé (A) à diminuer ou supprimer la luminescence d'un autre composé (D)
lorsque ceux-ci sont suffisamment proches ("Quench"). La gamme de molécules A
pouvant être utilisées est donc plus étendue et inclut ainsi des composés non
30 luminescents tels que des métaux lourds, des atomes lourds, des molécules chimiques comme par exemple le rouge de méthyle, des nanoparticules telles que celles vendues sous la dénomination Nanogold® par la société Nanoprobes (USA), ou bien encore les

molécules vendues sous les dénominations DABCYL® (Eurogentec, Belgique), QSY Dyes (Molecular Probes Inc., USA), ElleQuencher® (Oswell/Eurogentec) ou Black Hole Quenchers® (Biosearch Technologies Inc., USA).

A titre d'exemples :

5 - le brevet américain n° 3,996,345 décrit une méthode mettant en œuvre des paires de molécules fluorescente/"Quencher" dans des dosages utilisant des anticorps comme récepteurs ;

- la méthode proposée par Adamczyk M *et al.* (Organic Letters, 2001, 3, 1797-1800) utilise une protéine bioluminescente (Aequorine®) comme
10 donneur et du QSY-7 ou du DABCYL® comme accepteur ou "Quencher". D est couplée à une molécule de biotine et A à une molécule d'avidine. La formation du complexe biotine/avidine provoque une diminution de la bioluminescence de D, la présence de biotine libre ou couplée à une protéine va induire une compétition avec la biotine couplée à D pour la complexation avec l'avidine, la bioluminescence de D sera
15 alors proportionnelle à la quantité de biotine ajoutée ;

- Lee M. *et al.* (J. Agr. Food Chem., 1999, 47, 2766-2770) et Schobel *et al.* (Bioconjugate Chem., 1999, 10, 1107-1114) décrivent l'utilisation de deux molécules fluorescentes comme donneur et "Quencheur". Le donneur est couplé à un anticorps et l'accepteur est couplé à l'analyte. Comme précédemment la formation
20 du complexe anticorps-D/analyte-A provoque une diminution de la fluorescence de D, qui est restaurée par la présence de l'analyte dans le milieu ;

- Dubertret B. *et al.* (Nature Biotechnology, 2001, 19, 365-370) et Bonnet *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci., 1999, 96, 6171-6176) décrivent l'utilisation d'un acide polynucléique ("Beacon") qui a la particularité de s'hybrider avec lui-même en se repliant. Selon la méthode décrite dans cet article un composé fluorophore (D) est
25 fixé à l'extrémité 3' de l'acide polynucléique et un accepteur (A : nanoparticule ou DABCYL®) est fixé à l'extrémité 5'. Les deux extrémités du "Beacon" étant proches, la fluorescence de D est diminuée par A. La présence d'un acide polynucléique (analyte) pouvant s'hybrider avec une région du "Beacon" va induire une linéarisation de ce dernier et donc une augmentation de la distance entre D et A, et ainsi diminuer
30 l'atténuation de la fluorescence de D par A ;

- le brevet américain n° 5,279,943 propose une méthode de détection d'un analyte dans laquelle des atomes lourds sont utilisés comme "quencher" de la luminescence ;

5 - le brevet américain n° 5,229,302 décrit un procédé de détection d'un analyte dans un milieu dans lequel un composé chimique est couplé à un ligand ou à un analogue de celui-ci qui, lorsque le complexe anticorps/ligand est formé, atténue la fluorescence émise par l'anticorps lors d'une excitation à 280 nm. La présence de l'analyte dans le milieu va induire une compétition pour la complexation avec l'anticorps et ainsi restaurer la fluorescence de l'anticorps ;

10 - Chen C.T. *et al.* (Science, 1998, 279, 851-852) ont décrit une méthode de détection d'un analyte dans un milieu au moyen d'un récepteur synthétique sur lequel est fixé un fluorophore et un quencher. En absence d'analyte le quencher est suffisamment proche du fluorophore pour diminuer sa fluorescence. La complexation de l'analyte sur le récepteur va augmenter la distance entre le quencher et le
15 fluorophore et ainsi augmenter la fluorescence de ce dernier.

Il est à noter que l'ensemble des dosages utilisant le transfert d'énergie décrits précédemment sont des dosages en phase homogène.

Or, dans le cadre d'une détection en continue d'un analyte, les dosages en flux semblent particulièrement adaptés car ils permettent un apport
20 permanent en échantillon.

C'est ainsi que plusieurs types de dosage en flux ont déjà été décrits :

- plusieurs Auteurs ont notamment proposé des procédés de dosage d'analytes mettant en œuvre un anticorps immobilisé sur les parois d'un capillaire, cet anticorps étant saturé par un analyte marqué ou par un analogue marqué de celui-ci.
25 Le passage de l'analyte dans le capillaire induit une compétition avec l'analyte marqué pour la liaison avec l'anticorps. Ainsi, une certaine quantité de l'analyte marqué va être libérée et détectée en sortie du capillaire (voir notamment les brevets américains n° 5.183.740 et 6,323.041 et Sheikh *et al.* Biosensor & Bioelectronics, 2001, 16, 647-652) ;

30 - à l'inverse, Barzen C. *et al* (Biosensor & Bioelectronics, 2002, 17, 289-295) ont décrit un procédé de détection d'un analyte dans lequel ils utilisent une phase solide sur laquelle est immobilisé l'analyte ou un analogue de l'analyte à

détecter. L'échantillon contenant ou non l'analyte à détecter est préincubé avec un anticorps anti-analyte marqué. Lors du passage de cette solution sur la phase solide, les anticorps non-complexés vont se fixer sur la phase solide *via* l'analyte immobilisé. Ainsi le signal fluorescent mesuré au niveau de la phase solide est inversement proportionnel à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon ;

- Plowman T.E., *et al.* (Anal. Chem., 1999, 71, 4344-4352) ont développé une méthode de dosage permettant de doser simultanément, sur une même phase solide, différents analytes. Selon cette méthode, des anticorps reconnaissant différents analytes sont immobilisés sur une phase solide à des endroits distincts. Une solution, contenant l'échantillon (avec les différents analytes) et différents anticorps anti-analytes marqués à l'aide d'un fluorophore, est déposée sur la phase solide. Enfin, on mesure la fluorescence qui est issue de la complexation des anticorps de capture, de l'analyte et des anticorps traceurs correspondant aux différents sites d'immobilisation des anticorps. Comme pour le dosage précédent la nécessité de mélanger l'analyte avec un anticorps marqué rend ce procédé difficilement applicable à un dosage en continu car cela impliquerait un apport permanent en réactif ;

- Ligler F.S. *et al.* (Environmental Science & Technology, 1998, 32, 2461-2466) ont développé un biocapteur permettant de détecter des molécules présentes dans l'air. Ce biocapteur est constitué d'une fibre sur laquelle sont couplées des molécules d'avidine. Des anticorps anti-analytes biotinylés sont immobilisés sur cette fibre *via* le complexe avidine/biotine. La détection s'effectue en passant l'échantillon (molécules présentes dans l'air, solubilisées dans un tampon) sur cette fibre puis des anticorps anti-analytes marqués avec un fluorophore. Enfin la fluorescence, issue de la complexation des anticorps de capture, de l'analyte et des anticorps traceurs, est mesurée. Cependant, les différentes étapes nécessaires à la réalisation de ce procédé et l'apport en anticorps marqués qui devrait être permanent ne permettent pas une réelle détection en continue.

Il ressort donc de la description des différents procédés de détection connus de l'art antérieur, que tous les dosages en flux disponibles à ce jour sont des dosages en phase hétérogène (phase solide/phase liquide). En effet des dosages en phase homogène en flux nécessiteraient l'apport en continu de récepteurs et/ou d'analytes marqués, ce qui serait coûteux et plus difficile à mettre en œuvre.

Enfin, il a également déjà été proposé, notamment dans le brevet américain n° 5,976,896 l'utilisation de capillaires pour effectuer des dosages d'analytes en phase hétérogène selon un procédé pouvant être réalisé conformément à plusieurs variantes :

- 5 - selon une première variante de ce procédé, un premier récepteur de l'analyte à détecter est immobilisé à la surface intérieure du capillaire. L'échantillon contenant l'analyte est préincubé avec un second récepteur (ne possédant pas le même site de fixation sur l'analyte que le premier récepteur fixé sur le capillaire) marqué avec un composé fluorescent. Cette solution, après réaction, est introduite dans le
10 capillaire, le complexe analyte/récepteur marqué va alors se fixer sur la surface du capillaire en se liant au premier récepteur. Après lavage, le signal fluorescent, qui est proportionnel à la quantité d'analyte dans l'échantillon, est mesuré ;
 - selon une deuxième variante de ce procédé, un analogue de l'analyte est immobilisé à la surface intérieure du capillaire. L'échantillon contenant
15 l'analyte à détecter, préalablement préincubé avec un récepteur de l'analyte marqué avec un composé fluorescent, est introduit dans le capillaire. Il va se produire une compétition entre l'analyte fixé sur la surface du capillaire et l'analyte éventuellement présent dans l'échantillon pour la fixation sur le récepteur marqué. Après lavage, le
20 signal fluorescent, qui est inversement proportionnel à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon, est mesuré ;
 - selon une troisième variante de ce procédé, un récepteur de l'analyte à détecter est immobilisé à la surface intérieure du capillaire. L'échantillon contenant l'analyte préalablement mélangé avec un analyte marqué ou un analogue de cet analyte marqué avec un composé fluorescent est introduit dans le capillaire. Il va
25 alors se produire une compétition entre le composé marqué et l'analyte de l'échantillon pour la fixation sur le récepteur fixé à la surface du capillaire. Après lavage, le signal fluorescent, qui est inversement proportionnel à la quantité d'analyte dans l'échantillon, est mesuré.

30 Les différentes étapes de ces dosages (incubations, lavages) et la nécessité de mélanger l'analyte avec un composé marqué rend difficilement applicable ce dosage à un dosage en continu car cela impliquerait un apport permanent en réactif.

Par ailleurs, l'ensemble des procédés de détection d'analytes en phases hétérogènes précédemment décrits nécessite le plus souvent la réalisation d'une étape distincte de régénération de la phase solide avant de pouvoir effectuer une nouvelle détection de l'analyte au sein d'un nouvel échantillon. Cette étape limitante de régénération de la phase solide interdit par conséquent l'application de ces différents procédés à la détection en continu d'un analyte dans un milieu.

C'est donc afin de remédier à l'ensemble de ces inconvénients et de pourvoir en particulier à un procédé de détection en phase hétérogène d'un analyte, qui soit simple à mettre en œuvre, automatisable et au cours duquel l'étape de régénération de la phase solide puisse être réalisée simultanément à l'étape de détection de l'analyte proprement dite sans interrompre cette dernière, que les Inventeurs ont mis au point ce qui fait l'objet de la présente Invention.

Les Inventeurs se sont également donnés pour but de pourvoir à un nouveau réactif utilisable dans des procédés de détection d'analytes en phase hétérogène permettant d'éviter toute incubation, préalablement à l'étape de détection proprement dite, de l'analyte avec un anticorps marqué ou un analyte marqué.

La présente Invention a donc pour premier objet un procédé de détection d'un analyte a dans un échantillon fluide, caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes suivantes :

- 20 1) la saturation d'un support solide comportant, sur au moins une partie de sa surface, au moins un réactif trifonctionnel (tripode Y) comportant les trois pôles fonctionnels suivant :
 - i) un groupement luminescent (L),
 - ii) une molécule (B) choisie parmi l'analyte a, un analogue de l'analyte a ou un fragment de l'analyte a; et
 - 25 iii) une fonction assurant la fixation dudit réactif trifonctionnel sur la surface dudit support solide ;
- par un récepteur de l'analyte a, ledit récepteur étant marqué par un composé accepteur (Q) (récepteur-Q) de la luminescence du groupement L, pour former un complexe C entre ladite molécule (B) et ledit récepteur-Q ;
- 30 2) la mise en contact du support solide obtenu à l'étape 1) avec un échantillon fluide susceptible de renfermer l'analyte a à détecter ;

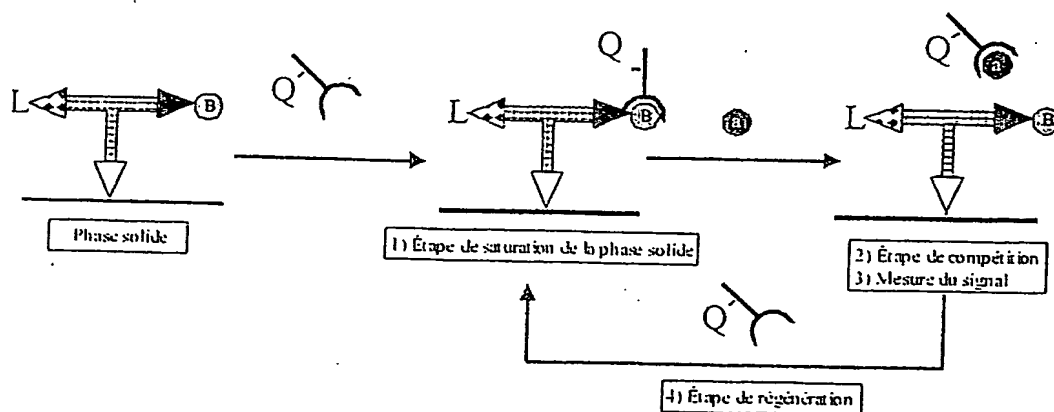
3) la mesure de l'intensité du signal émis par le groupement L qui est proportionnelle à la quantité d'analyte a présent au sein de l'échantillon fluide ; et

4) la régénération du support solide par mise en contact dudit support solide avec du récepteur-Q.

- 5 Selon ce procédé, l'étape 1) permet la complexation de la molécule (B) avec le récepteur-Q. A l'issue de cette première étape la luminescence de L est diminuée ou supprimée. Lors de l'étape 2), la mise en présence de l'échantillon avec la surface du support solide va induire, lorsque ledit échantillon renferme l'analyte a , une compétition entre l'analyte a et la molécule (B) pour la formation du complexe avec le récepteur-Q. La liaison de l'analyte a sur le récepteur-Q va provoquer l'élimination du récepteur-Q de la surface du support solide et restaurer la luminescence émise par le composé (L) présent sur le tripode Y. L'intensité du signal mesuré lors de l'étape 3) est alors proportionnelle à la quantité d'analyte a présente dans l'échantillon à analyser. L'étape 4) de régénération va entraîner à nouveau la complexation du récepteur-Q sur le tripode Y et ainsi la suppression de la luminescence de L pour permettre une nouvelle détection de l'analyte a au sein d'un nouvel échantillon.

Le principe du procédé de détection d'un analyte a conforme à l'Invention est schématisé sur le Schéma A ci-après :

SCHÉMA A



20

Le procédé de détection conforme à l'Invention présente un grand nombre d'avantages:

1) grâce en particulier à la conformation structurale particulière du tripode Y mis en œuvre au cours du procédé, l'étape de régénération de la phase solide peut être réalisée très facilement, et ce sans altération de ses propriétés. En effet, dans tous les dosages en flux précédemment décrits, la mesure du signal s'effectue après formation d'un complexe lié à la phase solide. Par conséquent, et même si certains des procédés de dosage décrits par l'état antérieur de la technique permettent plusieurs dosages successifs (Sheikh *et al.* et brevets américains n° 5,183,740 et 6,323,041 ; précités), ceux-ci sont néanmoins en nombre limité, et nécessitent une étape de régénération du support solide souvent longue et contraignante, qui se traduit par la dissociation du complexe formé. De plus, les conditions drastiques de réalisation de ces étapes de régénération (passage de solutions acides ou basiques) imposent l'arrêt du procédé de détection interdisant ainsi toute application de ces procédés à des dosages en continu d'un analyte donné.

Par contre, selon le procédé de détection conforme à l'Invention, la présence de l'analyte a dans l'échantillon entraîne la dissociation entre le récepteur-Q et la molécule (B), l'étape de régénération consiste donc tout simplement à reformer ce complexe en ajoutant du récepteur-Q. Cette étape de régénération n'implique donc pas l'utilisation de solutions acides ou basiques pouvant altérer les propriétés des molécules de la phase solide ou une réaction d'échange entre deux molécules au niveau du site de liaison du récepteur dont la cinétique est plus longue que la réaction de formation d'un complexe.

2) le signal mesuré au niveau de la région sur laquelle a été immobilisé le tripode Y ce qui permet d'obtenir un signal localisé, contrairement aux dosages développés selon l'art antérieur, notamment par Sheikh *et al.*, ainsi que dans les brevets américains n° 5,183,740 et 6,323,041 pré-cités, dans lesquels le signal, lié à des molécules en solution, est mesuré à la sortie d'un capillaire.

3) le signal étant localisé, plusieurs molécules pourront être détectées simultanément sur le même support solide en fixant sur des zones distinctes et connues de celui-ci plusieurs types tripodes Y différant les uns des autres par la nature de la molécule (B) qu'ils comprennent.

4) le signal mesuré correspond à la totalité des molécules d'analyte a ayant été en contact avec le support solide entre deux régénérations. Cette particularité

du procédé conforme à l'Invention autorise un suivi permanent tout en effectuant des mesures espacées dans le temps.

5) ce format de dosage est applicable à l'ensemble des molécules car il ne requiert pas la liaison simultanée de deux récepteurs sur l'analyte comme cela est quelque fois nécessaire selon les procédés de dosage antérieurement connus comme par exemple dans le procédé décrit par Plowman T.E. *et al.*, pré-cité) et qui nécessitent une taille suffisante de l'analyte.

6) la présence de l'analyte a dans l'échantillon se traduit par une apparition de signal contrairement à la plupart des dosages par compétition connus de l'art antérieur, l'apparition d'un signal autorisant une détection plus aisée.

7) enfin, le système de détection utilisant le phénomène de transfert d'énergie, il permet également de détecter et de quantifier la présence d'un analyte a par la variation de la luminescence du composé Q s'il est fluorescent ou la variation du temps apparent de décroissance de la luminescence du composé (L).

Selon une forme de réalisation particulièrement préférée du procédé conforme à l'Invention, les étapes 3) de mesure de l'intensité du signal émis et 4) de régénération de la surface du support solide sont réalisées en continu.

Selon l'Invention, le support solide est de préférence choisi parmi les matériaux comportant à leur surface, de façon naturelle ou après modification, des fonctions aptes à former une liaison de nature covalente avec une fonction complémentaire du tripode Y. Ces fonctions peuvent notamment être des fonctions hydroxyle, amine, sulfhydryle ou carboxyle.

Parmi de tels matériaux, on peut en particulier citer les verres, les plastiques (par exemple le polystyrène), les céramiques (de préférence de type oxyde), les métaux (par exemple l'aluminium ou l'or) et les métalloïdes (tel que le silicium oxydé).

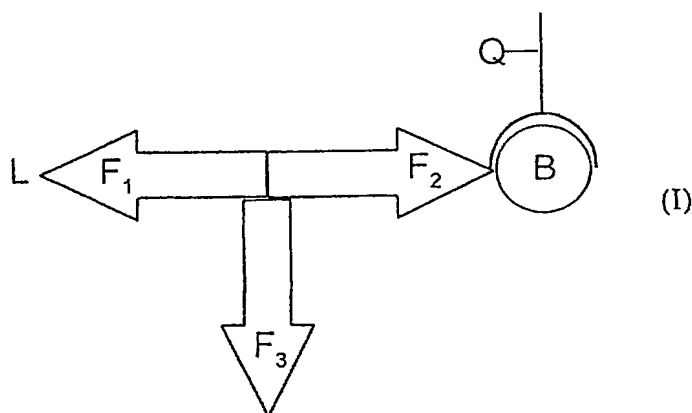
De tels supports peuvent notamment se présenter sous la forme de tubes, de capillaires, de plaques telles que des microplaques, de billes ou sous toute autre forme appropriée à la réalisation du procédé conforme à l'Invention.

L'échantillon fluide contenant ou non l'analyte a à détecter peut être de nature ou d'origine diverses telles que par exemple de l'eau, un milieu biologique

liquide, ou bien encore un liquide contenant des molécules gazeuses dissoutes ou provenant d'échantillons solides.

La mesure de l'intensité du signal émis lors de l'étape 3) peut être effectuée par un détecteur de luminescence tel que par exemple un fluorimètre.

- 5 Selon le procédé conforme à l'Invention, le complexe C formé à l'issue de l'étape 1) de saturation est de préférence choisi parmi les complexes de formule (I) suivante :



dans laquelle :

- 10 - les flèches représentent la structure du squelette du tripode Y qui est un bras de liaison constitué par une chaîne peptidique, nucléotidique, glucosidique ou par une chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ; lesdites chaînes étant éventuellement substituées, interrompues et/ou terminées par un ou plusieurs hétéroatomes tels que N, O ou S et/ou par un ou plusieurs acides aminés, et
- 15 comportant trois fonctions chimiques réactives F_1 , F_2 et F_3 ;
- L représente un groupement luminescent lié de façon covalente au tripode Y par l'intermédiaire de la fonction chimique réactive F_1 ;
- B représente un analyte \underline{a} , un analogue structurel d'un analyte \underline{a} ou un fragment d'un analyte \underline{a} sur lequel est fixé, de façon non covalente et réversible, un
- 20 récepteur spécifique de l'analyte \underline{a} , ledit récepteur étant marqué par un composé Q ; la molécule (B) étant liée de façon covalente au tripode Y par l'intermédiaire de la fonction chimique réactive F_2 ;

- Q représente un composé accepteur de la luminescence du groupement L ;

- F₃ représente une fonction chimique réactive apte à permettre la fixation du tripode Y sur la surface du support solide.

5 Selon l'Invention et indépendamment l'une de l'autre, les fonctions F₁, F₂, F₃ assurent :

i) soit une liaison directe *via* une fonction chimique correspondante présente sur le composé luminescent, la molécule (B) ou la phase solide ;

10 ii) soit une liaison indirecte. Dans ce deuxième cas, la liaison peut être réalisée en couplant à l'une au moins des fonctions F₁, F₂ et/ou F₃, une molécule M₁ apte à former un complexe avec une molécule M₂ préalablement fixée sur au moins une partie de la surface de la phase solide, sur la molécule (B) et/ou sur le groupement luminescent. A titre d'exemple, on peut notamment coupler de la biotine ou de la streptavidine (ou neutravidine ou avidine) sur l'une des fonctions F₁, F₂ et F₃ et respectivement de la streptavidine (ou neutravidine ou avidine) ou de la biotine sur la phase solide, sur la molécule (B) et/ou sur le composé luminescent. Selon une autre variante du procédé conforme à l'Invention, cette liaison indirecte peut également s'effectuer *via* une molécule M₃, préalablement couplée sur la phase solide avec un ou plusieurs composés luminescents ou molécules (B) et qui sera couplée à la fonction F₁, F₂ ou F₃. A titre d'exemple de molécules M₃, on peut notamment utiliser des protéines telles que l'albumine et la polylysine, des nucléotides, des sucres ou encore d'autres dérivés synthétiques.

25 De préférence, F₁, F₂ et F₃, identiques ou différentes, sont choisies parmi les fonctions thiols ; amines ; alcools ; acides tels que les fonctions acide carboxylique ; esters tels que les esters activés comme par exemple les esters succinimydiliques et les anhydrides ; isothiocyanates ; isocyanates ; acylazides ; chlorures de sulfonyle ; aldéhydes ; glyoxals ; époxydes ; oxiranes ; carbonates ; imidoesters ; carbodiimides ; maléimides ; nitriles, aziridines ; acryloyl ; les dérivés halogénés ; les groupements disulfides ; phosphorés tels que par exemple les phosphates, phosphonates, phosphines et phosphites ; diazo ; carbonyldiimidazole ; hydrazides ; arylazides ; hydrazines ; diazirines ; magnésiens ; lithiens ; cuprates ; zinciques et les systèmes insaturés.

Parmi ces différentes fonctions et groupements, on peut en particulier citer les fonctions amines telles que celles de formules $R-NH_2$, $R-NH-$, $(R)_3-N$, $R-NH-OR$ et NH_2-OR ; les fonctions alcool $R-OH$; et les groupements halogénés de formule $R-X$ avec X représentant un atome d'halogène tel que le chlore, l'iode, le brome ou le fluor ; étant entendu que dans lesdites formules R représente un radical, alkyle, de préférence en C_1-C_{15} , aryle, vinyle, ou allyle.

Selon l'Invention, on entend par groupement aryle, tout groupement aromatique possédant un ou plusieurs noyaux benzéniques, naphthalénique ou anthracéniques, lesdits noyaux contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes tels que O , N ou S , et étant éventuellement substitués par un ou plusieurs groupes choisis parmi les atomes d'halogène, les radicaux alkyles en C_1-C_4 , amino, aminoalkyle en C_1-C_4 , alkyl(C_1-C_4)aminoalkyle en C_1-C_4 , dialkyl(C_1-C_4)aminoalkyle en C_1-C_4 , nitro, alkylèneamino en C_1-C_4 ou alkénylèneamino en C_2-C_4 .

Parmi de tels groupements aryle, on peut en particulier citer les groupements benzyle, phényle, crésyle, toluyle, pyridine, pyrimidine et pyrazine.

Selon l'Invention, on entend par groupement luminescent toute substance qui, quand elle est excitée à une longueur d'onde donnée ou par un composé chimique donné, est capable d'émettre un photon, par exemple fluorophore ou terre rare.

Parmi de tels groupements luminescents, on peut notamment citer la fluorescéine (fluorescéinate de sodium) et ses dérivés tels que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ; la rhodamine et ses dérivés tels que la tétraméthyl rhodamine isothiocyanate (TRITC) ; le diaminidophényl indo (DAPI) ; l'acridine ; les colorants fluorescents à amines réactives tels que l'ester succinimidylique de l'acide 6-((7-amino-4-méthylcoumarin-3-acétyl)amino) hexanoïque (AMCA) ; les colorants fluorescents vendus sous les dénominations commerciales BODIPY® tels que BODIPY® FR-Br₂, BODIPY® R6G, BODIPY® TMR, BODIPY® TR et les BODIPY® 530/550 (longueur d'onde d'excitation/longueur d'onde d'émission, en nm), 558/567, 564/570, 576/589, 581/591, 630/650 et 650/665 vendus par la société Bio-Rad Inc. (USA), les colorants Cascade Blue (Trilink BioTechnologies (USA), Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, et Cy7 (Bio-Rad Inc., USA), DABCYL® et EDANS® (Eurogentec, BE) ; l'Eosine ; l'Erythrosine ; le 6-Fam et le Texas Red.

Selon l'Invention, on entend par "récepteur" toute substance apte à former une liaison non covalente et réversible (complexe) avec l'analyte, un analogue de l'analyte ou un fragment de ce dernier. Ce récepteur est bien évidemment choisi en fonction de la nature de la molécule (B) du tripode Y.

5 Ces récepteurs peuvent notamment être choisis parmi les composés de nature biologique (anticorps sous forme entière, fragmentaire ou recombinante (Fab', Fab, scFv), récepteurs, acides polynucléiques (ADN ou ARN), acides peptidonucléiques, lectines ou bien encore protéines transporteuses) et les composés de nature chimique tels que par exemple les chélates et les récepteurs synthétiques
10 spécifiques.

Parmi de tels récepteurs, on peut par exemple citer les anticorps monoclonaux anti-Substance P anti-protéine prion, anti-angiotensine II, la poly-Histidine, le système nitrilo-acide triacétique-Nickel (NTA-Nickel), les sondes
nucléotidiques complémentaires.

15 Selon une variante préférée du procédé de détection conforme à l'Invention, ledit récepteur présente une plus grande affinité pour l'analyte a que pour la molécule (B).

Selon l'Invention, on entend par "composé accepteur" (Q), toute molécule permettant la diminution ou la disparition de la luminescence du composé
20 luminescent (L) lorsque le récepteur est complexé à la molécule (B). Ce composé, de natures diverses, peut notamment être un composé chimique (luminescent ou non), un atome lourd ou une nanoparticule.

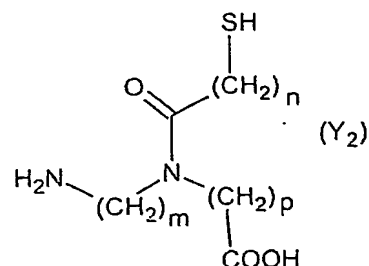
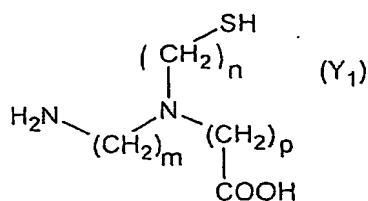
Parmi de tels composés (Q), on peut en particulier citer les composés fluorescents tels que ceux cités ci-dessus pour les groupements L, la
25 rhodamine et ses dérivés tels que la tétraméthyl rhodamine (TMR), des molécules non-fluorescentes telles que les composés vendus sous les dénominations commerciales Black Hole Quencher ® 1, 2 et 3 (Biosearch Technologies), Nanogold Particules ® (Nanoprobes), Eclipse Dark Quencher ® (Epoch Bioscience), Elle Quencher ® (Oswell), le vert de malachite, et les colorants QSY ® 7, QSY ® 9 et
30 QSY ® 21 (Molecular Probes).

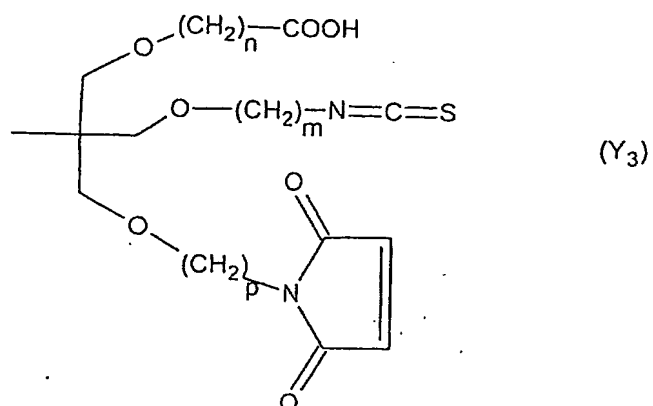
Lorsque la molécule (B) est un peptide ou un oligonucléotide, alors le tripode Y utilisé selon le procédé conforme à l'Invention peut être préparé en

effectuant une synthèse peptidique ou oligonucléotidique au cours de laquelle on ajoute à ladite molécule (B) au moins un acide aminé (ou nucléotide modifié) comportant une fonction (F_1) et un autre acide aminé (ou nucléotide modifié) comportant une fonction (F_3), F_1 et F_3 ayant les mêmes significations que celles indiquées ci-dessus. Dans ce cas, F_1 et F_3 assurent également la liaison respectivement avec le composé luminescent (L) et la surface de la phase solide. Tout comme précédemment, les acides aminés (ou nucléotides) comportant les fonctions chimiques F_1 et F_3 peuvent également être substitués par un acide aminé (ou nucléotide) couplé à une biotine (par exemple le produit 9-fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc)-Lysine(Biotine)-OH, vendu par la société Calbiochem-Novabiochem AG). Dans ce cas, cet acide aminé (ou nucléotide) assurera la liaison avec la surface de la phase solide ou avec le composé luminescent (L) sur lesquels on aura préalablement couplé de la streptavidine (ou neutravidine ou avidine) pour former une liaison indirecte.

Parmi les complexes C de formule (I) conformes à l'Invention, on peut notamment citer les composés dans lesquels :

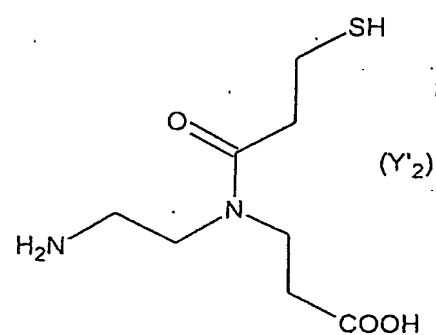
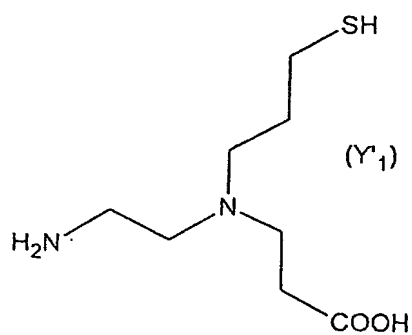
- i) (B) est choisi parmi les peptides, les protéines, les oligonucléotides, les sucres et les acides peptidonucléiques,
- ii) L est de la fluorescéine, et
- iii) le squelette du tripode Y est choisi parmi les structures Y_1 à Y_3 suivantes :

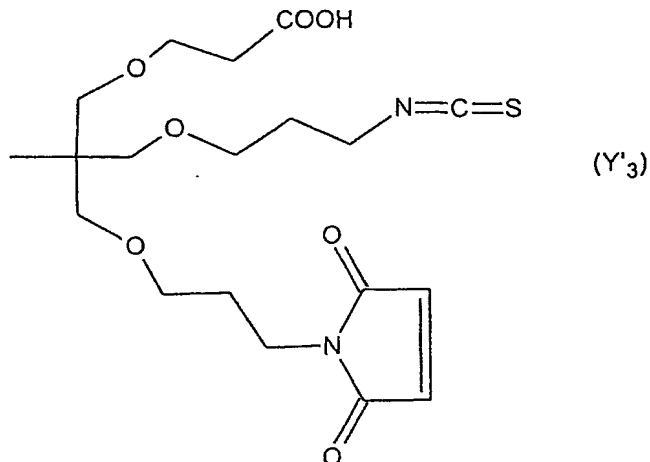




dans lesquelles n , m et p , identiques ou différents, sont des nombres entiers compris entre 1 et 20 inclusivement.

Parmi ces structures Y_1 à Y_3 , les composés de formules (Y'_1) à (Y'_3) suivantes sont particulièrement préférés :





Les tripodes Y utilisés dans le procédé conforme à l'Invention peuvent être préparés par analogie selon les procédés de synthèse organique et peptidique classiquement mis en œuvre et bien connus de l'homme du métier.

5 Les complexes C de formules (I) tels que décrits précédemment sont des composés nouveaux en soi qui, à ce titre, constituent un autre objet de l'Invention.

Ces complexes C de formule (I) peuvent être préparés en complexant un tripode Y conforme à l'Invention avec un récepteur-Q selon les procédés classiquement mis en œuvre dans l'état de la technique.

10 L'Invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un complexe C de formule (I) dans un procédé de détection en continu en phase hétérogène d'un analyte a au sein d'un échantillon fluide.

Enfin, l'Invention a pour objet un dispositif de détection en continu en phase hétérogène d'au moins un analyte a dans un échantillon fluide, ledit dispositif étant caractérisé par le fait qu'un échantillon fluide à analyser est intégré dans un milieu formant un flux s'écoulant sur au moins un support solide à la surface duquel est fixé au moins un tripode Y conforme à l'Invention tel que décrit précédemment et spécifique de l'analyte a à détecter, un détecteur de luminescence disposé en regard du support solide est couplé à une commande de vanne asservie à un seuil d'intensité de signal émis par le détecteur et qui déclenche, pendant une durée déterminée, l'ouverture d'un réservoir renfermant un récepteur-Q apte à former un complexe avec le tripode Y, ce réservoir étant relié au support par une boucle de rétroaction qui

15

20

débouche en amont du support solide sur lequel est fixé le tripode Y, afin de saturer et/ou régénérer ce dernier en récepteur-Q par passage dans le flux et complexation sur le tripode Y.

Selon des formes de réalisation particulières :

- 5 - les valeurs de l'intensité de la luminescence sont monitorées et accessoirement traduites en quantité d'analyte a par un système de calcul couplé au détecteur de luminescence ;
- un marqueur d'évènement tel que par exemple une alarme, est disposé dans la boucle de rétroaction afin de signaler une variation de l'intensité du
- 10 signal supérieure à une valeur prédéterminée ;
- le support solide est un capillaire couplé à l'environnement contenant l'échantillon à analyser, le couplage étant réalisé soit par l'intermédiaire d'un ballon de capture où l'échantillon barbote dans un milieu correspondant à celui du flux d'écoulement, soit par l'intermédiaire d'un conduit souple ;
- 15 - le flux est entraîné par la dépression produite par une pompe, un piston, ou équivalent.

Ces dispositifs peuvent notamment être utilisés pour détecter la présence d'un analyte a dans un milieu naturel tels que dans des lacs et rivières notamment ou dans des milieux industriels tels que piscines, usines, stations

20 d'épuration, systèmes de ventilation ou de climatisation, etc. Ils peuvent, le cas échéant, être équipés d'un ballon de capture et d'un système de barbotage permettant de collecter des échantillons sous forme gazeuse tel que l'air et de solubiliser les constituants à détecter qu'ils renferment.

Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore

25 d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de synthèse de squelettes de tripodes Y, à un exemple de synthèse d'un complexe de formule (I) et à un exemple de détection de la substance P dans un échantillon fluide, ainsi qu'aux figures 1 à 7 annexées dans lesquelles :

- 30 - la figure 1 illustre une vue générale d'un exemple non limitatif de dispositif de détection en phase hétérogène selon l'Invention, pour mesurer la présence d'un analyte a dans une cuve de station d'épuration d'eau. Selon ce dispositif, un tuyau souple 1 relié à une sortie de cuve est monté sur un tube capillaire

3. Ce tube sert de support de fixation à deux types de tripode selon l'Invention, à savoir Ya et Yb, permettant la détection spécifique de deux types d'analytes. L'échantillon liquide provenant de la cuve est débité en flux continu (flèches Fa) dans le capillaire 3 par l'action d'une pompe péristaltique 5 puis évacué. A proximité du capillaire et face à chaque zone du capillaire sur laquelle sont fixés les tripodes Ya et Yb, il est prévu de positionner un fluorimètre, 7a et 7b, détecteur de fluorescence. Chaque détecteur est relié à un réservoir de récepteurs-Q, 9a et 9b, respectivement spécifiques des tripodes Ya et Yb. Les réservoirs sont reliés par des canaux latéraux, 11a et 11b, et un canal commun 11c, au capillaire 3, en amont des zones sur lesquelles sont fixés les tripodes Ya et Yb par rapport au sens d'écoulement du flux. Le canal commun est soudé perpendiculairement au capillaire 3 et l'ensemble des canaux forme des boucles de rétroaction. Chaque détecteur est couplé à une commande de vanne, respectivement 13a et 13b, pour ouvrir le réservoir correspondant, respectivement 9a et 9b, et permettre à son contenu de se déverser dans le capillaire 3 (flèches Fb), puis de se complexer sur le tripode spécifique correspondant, Ya ou Yb, via les canaux 11a, 11b et 11c afin de régénérer ce tripode. Dans cet exemple, la régénération peut être réalisée en continu, le seuil de déclenchement de cette opération de régénération correspondant à la variation de luminescence minimale pouvant être détectée suivant la sensibilité du détecteur. Un marqueur d'évènement 15a (respectivement 15b) est montée dans chaque boucle de rétroaction. En fonctionnement, et après étalonnage, l'intensité du signal fluorescent, Ia et Ib, émis par les tripodes Ya et Yb est mesurée par le fluorimètre, ce qui permet de calculer, à l'aide d'un calculateur annexé (non représenté), la concentration moyenne en analyte sous examen dans l'échantillon. La commande d'ouverture de vanne 13a (respectivement 13b) est asservie à l'intensité de signal fluorescent mesurée par le détecteur correspondant. L'ouverture de la vanne correspondante est alors déclenchée pendant la durée correspondant à la régénérescence des tripodes concernés. Si l'analyte a est présent dans l'échantillon lors de la régénération, cela se traduit par une augmentation de la durée de celle-ci (une partie du récepteur-Q se complexant à l'analyte a). La durée de la régénération peut être déterminée par le temps nécessaire à un retour de la fluorescence au niveau basal ; si celle-ci est supérieure à une valeur prédéterminée, un marqueur d'évènement pourra être déclenché. Lorsque l'intensité du

signal varie d'une quantité supérieure à une valeur prédéterminée, pendant un écart de temps donné, le marqueur d'événement 15a (respectivement 15b) signale ce fait par un avertissement 16 visuel et/ou sonore. Le signal fluorescent correspondant à l'ensemble des analytes a ayant transité dans le capillaire entre deux régénérations, la lecture de la

5 fluorescence peut également être effectuée à intervalles de temps réguliers. Dans d'autres exemples, lorsque l'échantillon est un gaz, le milieu mis en œuvre et les moyens de création de flux sont adaptés par l'homme du métier.

- la figure 2 représente la fluorescence mesurée en unités arbitraires après immobilisation sur une plaque de microtitration, *via* la neutravidine, d'un tripode

10 Y comprenant de la fluorescéine à titre de composé (L) et un analogue de la Substance P à titre de molécule (B), en fonction de la concentration en tripode en μM ;

- la figure 3 représente la courbe de diminution de la fluorescence (en unités arbitraires) d'un tripode comprenant de la fluorescéine à titre de composé (L) et un analogue de la Substance P à titre de molécule (B) en fonction de la quantité

15 d'anticorps monoclonal anti-substance P marqué à la tetraméthyl rhodamine (mAb SP31-TMR) (en nM) qui se complexe au tripode ;

- la figure 4 représente le pourcentage d'inhibition par la substance P de la diminution de la fluorescence provoquée par le mAb SP31-TMR (% ID) est exprimé en fonction de la concentration en substance P (en nM) ;

20 - la figure 5 représente la fluorescence mesurée (en unités arbitraires) après mise en contact d'un support solide sur lequel est fixé un tripode Y conforme à l'invention, ledit tripode étant ou non complexé au mAb SP31-TMR (puits Fl : fluorescence mesurée en absence de mAb SP31-TMR et de Substance P et puits Fl_0 : fluorescence mesurée en présence de mAb SP31-TMR mais en absence de

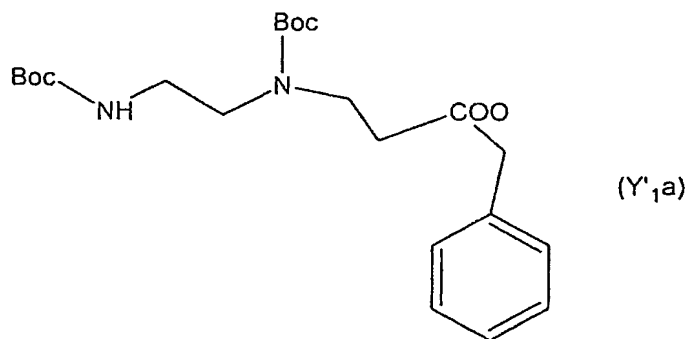
25 Substance P), et avec différentes concentrations de substance P (puits Fl_x : fluorescence mesurée en présence de mAb SP31-TMR avec x = concentration en substance P : 1 : 0.1 ou 0.01 μM), et ce lors d'un premier dosage, puis après régénération du support et enfin après une nouvelle mise en contact des puits avec les trois concentrations de substance P ;

30 - la figure 6 représente la moyenne de fluorescence mesurée (en unités arbitraires) pour chacun des puits Fl, Fl_0 et Fl_x , après 11 cycles de dosage de la substance P et de régénération ;

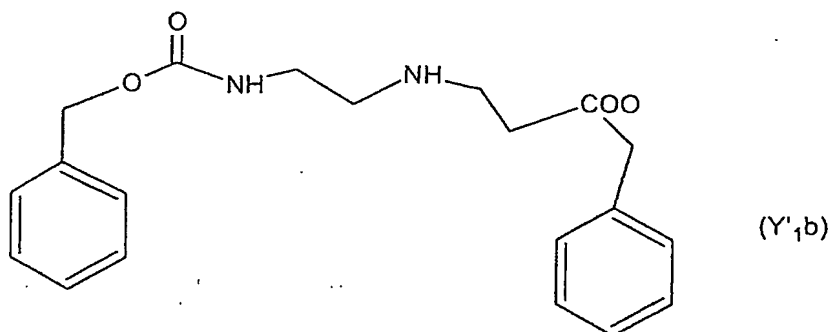
- la figure 7 représente la fluorescence (en unités arbitraires) mesurée pour chacun de 11 dosages effectués dans des puits Fl, Fl₀ et Fl_x, avec x = 1 μ M de substance P.

EXEMPLE 1 : PRÉPARATION D'UN SQUELETTE DE FORMULE (Y'₁)
D'UN TRIPODE Y CONFORME À L'INVENTION

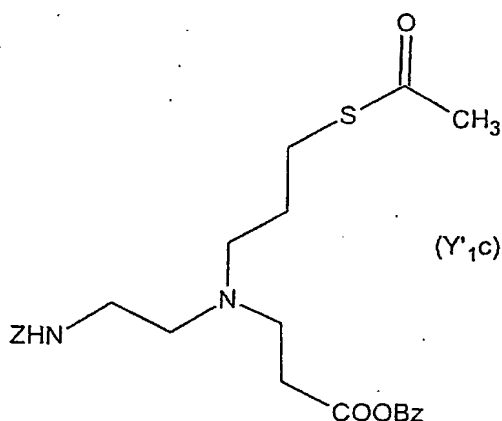
On fait réagir un équivalent de 1,2-éthyldiamine avec deux équivalents de (Boc)₂O pour conduire au bis-(tertiobutyloxycarbonylamino)-1,2-éthyl qui est ensuite mis à réagir avec un équivalent de phényl-3-bromopropanoate en présence d'hydruure de sodium pour conduire au composé de formule (Y'₁a) suivante:



On déprotège le composé Y'₁a en milieu trifluoroacétique puis on réalise la condensation du composé déprotégé obtenu en présence de triéthylamine (TEA) et de un équivalent de chlorure de Z (avec Z = carbobenzyloxy) pour obtenir un composé de formule (Y'₁b) suivante :



Le composé de formule (Y'1b) conduit ensuite, en présence de S-(3-chloropropyl) éthanethioate et de TEA, au composé de formule (Y'1c) suivante :

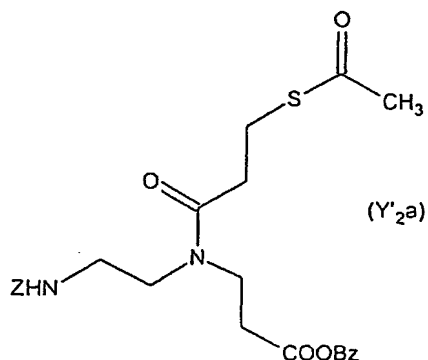


5 dans laquelle Z a la même signification que celle indiquée pour le composé de formule (Y'1b) ci-dessus et Bz désigne un groupement benzyle.

On déprotège les fonctions acide et amine primaire du composé de formule (Y'1c) en présence de palladium sur charbon et la fonction thiol par action d'hydroxylamine pour conduire au composé de formule (Y'1).

10 **EXEMPLE 2 : PRÉPARATION D'UN SQUELETTE DE FORMULE (Y'2)
D'UN TRIPODE Y CONFORME À L'INVENTION**

De l'acide 3-[(2-oxopropyl)thio]propanoïque, préparé à partir d'acide 3-bromopropoïque et d'acide éthanethioïque est mis à réagir avec le composé de formule (Y'1b) obtenu ci-dessus à l'exemple 1 pour conduire au composé de formule
15 (Y'2a) suivante :

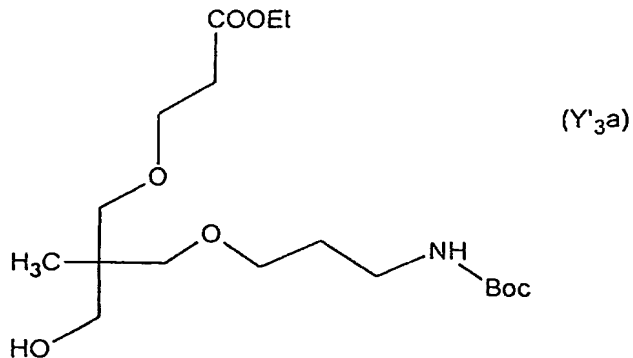


dans laquelle Z désigne un groupement carbobenzyloxy et Bz désigne un groupement benzyle.

On déprotège les fonctions acide et amine primaire du composé de formule (Y'_{2a}) ci-dessus en présence de palladium sur charbon et la fonction thiol par action d'hydroxylamine pour conduire au composé de formule (Y'₂) décrit précédemment.

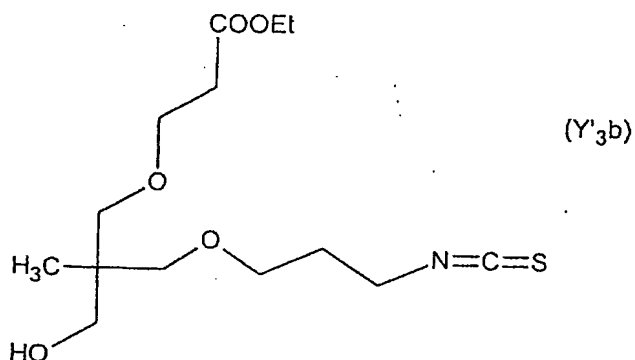
EXEMPLE 3 : PRÉPARATION D'UN SQUELETTE DE FORMULE (Y'₃) D'UN TRIPODE Y CONFORME À L'INVENTION

On fait réagir un équivalent de 2-(hydroxyméthyl)-2-méthylpropane-1,3-diol et un équivalent d'éthyl 3-bromopropanoate en présence d'hydruire de sodium pour conduire à l'éthyl 3-[3-hydroxy-2-(hydroxyméthyl)-2-méthylpropoxy]propanoate. On fait ensuite réagir ce composé, en présence d'hydruire de sodium, avec un équivalent de *tert*-butyl 3-bromopropylcarbamate pour conduire au composé de formule (Y'_{3a}) suivante :

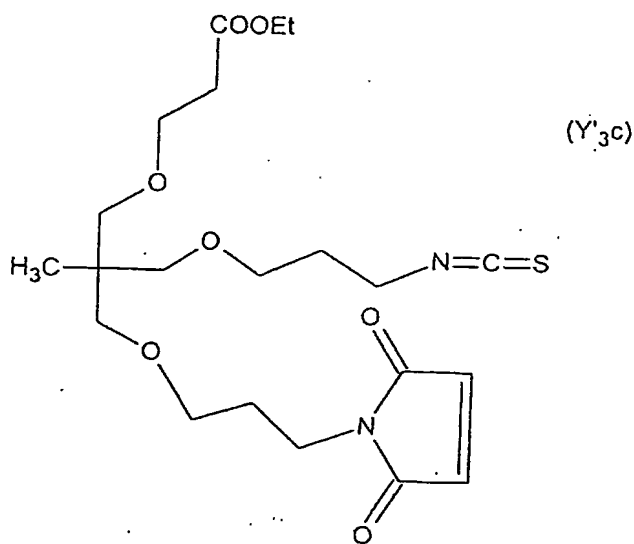


Le composé de formule (Y'3a) ci-dessus est ensuite déprotégé en milieu trifluoroacétique puis mis à réagir avec du dithioxométhane en présence de soude puis le groupement carboxylique est reprotégé par un mélange éthanol/acide sulfurique, pour conduire au composé de formule (Y'3b) suivante :

5



On fait ensuite réagir le composé de formule (Y'3b) ci-dessus avec du 1-(3-iodopropyl)-1H-pyrrole-2,5-dione en présence d'hydruure de sodium pour conduire au composé de formule (Y'3c) suivante :



10

qui en présence de soude conduit au composé (Y'3).

EXEMPLE 4 : PRÉPARATION D'UN TRIPODE Y CONFORME À L'INVENTION

Dans cet exemple, on illustre la préparation d'un tripode Y conforme à l'Invention comportant :

- 5 - un analogue de la substance P à titre de molécule (B),
- une fonction NH_2 permettant la fixation du tripode sur la surface d'un support solide (F_3),
- de la fluorescéine à titre de composé luminescent (L).

1) Préparation d'un analogue de la substance P

10 Pour mémoire, la séquence de la substance P (Poids moléculaire : $\text{PM} = 1349$) est la suivante :

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met- CONH_2
soit (SEQ ID N°1)- CONH_2 .

15 On prépare un analogue de la substance P correspondant à la séquence suivante ($\text{PM} : 1907$) :

Lys-Ser-Ser-Lys(Biotine)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Ala-Met- CONH_2 ;
soit (SEQ ID N°2)- CONH_2

20 Pour ce faire, le couplage de l'analogue de la substance P et de la biotine ainsi que de la fonction NH_2 s'effectue au cours d'une synthèse peptidique selon une méthode connue de l'homme de l'art comme par exemple une synthèse en phase solide telle que décrite par Merrifield (J. Am. Chem. Soc., 1964, 85, 2149-2154). L'analogue de la substance P est un peptide analogue de la substance P comportant une alanine en position 10 [Ala^{10}] qui a une réaction croisée de 13 % avec

25 la substance P pour l'anticorps monoclonal SP31 (Déry O., Biopolymers, 1996, 39, 67-74) qui est utilisé dans le dosage décrit ci-après comme récepteur. Cette plus faible affinité de l'anticorps monoclonal SP31 (mAb SP31) pour cet analogue par rapport à la substance P, permettra un meilleur déplacement de l'anticorps fixé sur la phase solide. Sur cet analogue, la lysine en position 3 (Lys3) a également été substituée par

30 une alanine afin d'éliminer l'amine primaire présente sur la chaîne latérale. La lys3 n'étant pas dans le site de reconnaissance du mAb SP31, cette substitution ne modifie par l'affinité de l'anticorps pour l'analogue. Par ailleurs, l'extrémité N-terminale a été

modifiée par ajout d'une lysine possédant une molécule de biotine sur la chaîne latérale (Fmoc-Lys(biotine)-OH), et deux Sérines suivies d'une Lysine possédant deux fonctions NH_2 dont une sur sa chaîne latérale.

Après la synthèse, le composé obtenu est purifié par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) puis lyophilisé.

2) Marquage de l'analogue de la substance P avec de la fluorescéine (L)

100 μg du composé obtenu ci-dessus en 1) ($5,28 \cdot 10^{-8}$ mol) sont dissous dans 100 μl de tampon borate 0,1 M de pH 9. On ajoute ensuite 30,8 μl ($5,28 \cdot 10^{-7}$ mol) d'une solution de fluorescéine-NH-Succinimide (PM 586,55) (ester succinimidylique de l'acide hexanoïque (6-(fluorescéine-5-(et-6)-carboxamido) vendu sous la référence F-6129 par la société Molecular Probes, Inc.) à 10 mg/ml dans du diméthylformamide (DMF). Après 16 heures d'agitation à une température de 4°C , on ajoute 100 μl de tampon Tris-HCl 1 M pH 9 et on poursuit l'agitation pendant 16 heures à 4°C , afin d'inactiver les fonctions esters actives résiduelles. Enfin, on ajoute 769,2 μl de tampon phosphate de potassium 0,1M pH 7,4 et 0,01 % d'azide de sodium. On obtient une solution d'un tripode Y conforme à l'Invention à $52,8 \mu\text{M}$. Ce tripode est conservé à une température de 4°C .

20 EXEMPLE 5 : DÉTECTION ET DOSAGE DE LA SUBSTANCE P DANS UN ÉCHANTILLON

1) Préparation d'un récepteur-Q : marquage de l'anticorps monoclonal anti-substance P SP31 avec de la tetraméthyl rhodamine (TMR) (Q) (conjugué mAb SP31-TMR)

A 880 μl de mAb SP31 à 1,136 mg/ml (1 mg correspond à 6,67 nmole) en tampon phosphate 0,1 M pH 7,4, on ajoute 3,5 μl d'une solution de TMR (PM 527,5) (ester succinimidylique de la 5-(et-6)-carboxytetraméthylrhodamine ; vendu sous la référence C1171 par la société Molecular Probes, Inc., à 50 mg/ml dans le DMF (176 μg : 333 nmole)). Après 16 heures d'agitation à 4°C , on ajoute 100 μl de tampon Tris-HCl 1M pH 9 et on poursuit l'agitation pendant 16 heures à 4°C , afin d'inactiver les fonctions esters actives résiduelles. Enfin, on sépare l'anticorps marqué de la TMR libre par chromatographie d'exclusion sur gel G-25 (Sephadex G-25 fine, Amersham Biosciences) en tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 renfermant 0,01 % d'azide de sodium. Les fractions correspondant à l'anticorps sont rassemblées

et on mesure l'absorbance de la solution à 280 et à 555 nm à l'aide d'une cuve dont le trajet optique est de 1 cm.

La concentration en anticorps est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Concentration (M)} = [A_{280} - (A_{555} \times 0,3)] / \epsilon$$

5

dans laquelle :

- A_{280} est l'absorbance à 280 nm
- A_{555} est l'absorbance à 555 nm
- 0,3 est le ratio de l'absorbance de la TMR à 280 nm et à 555 nm
- ϵ est le coefficient d'extinction molaire (pour IgG $\epsilon = 203000 \text{ cm}^{-1}$

10 M^{-1}).

On obtient une concentration en anticorps marqué de 1,36 μM .

Le calcul du degré de marquage peut être fait selon l'équation suivante :

Nombre de molécules de TMR par molécule d'anticorps =

15

$$A_{555} / (65\,000 \times \text{concentration en anticorps})$$

dans laquelle le nombre 65 000 correspond au coefficient d'extinction molaire à 555 nm de la TMR.

On obtient 3,6 moles de TMR par mole d'anticorps.

20 2) Préparation du support solide : Fonctionnalisation de la surface par de la neutravidine

Afin de pouvoir immobiliser le tripode Y préparé ci-dessus à l'exemple 4 sur un support solide, ce dernier est, dans un premier temps, fonctionnalisé par de la neutravidine.

a) Réactifs utilisés

25

Tampon de saturation :

- tampon phosphate de potassium 0,1M pH 7,4 ;
- NaCl 0,15 M ;
- Albumine sérique bovine (BSA) vendue sous la référence A-7906 par la société Sigma : 0,1 % ;
- 30 - Azide de sodium 0,01 %

Tampon de lavage :

- Tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 7,4 ;
- Tween ® 20 : 0,05 %

5 On dépose 100 µl d'une solution de neutravidine (vendue sous la référence 31 000 par la société Pierce) à 5 µg/ml dans du tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 dans les puits de microplaques noires vendues sous la dénomination High Bind Matrix par la société VWR (référence 80120696). Après 16 heures à température ambiante, les plaques sont lavées avec du tampon de lavage puis

10 saturées par dépôt de 300 µl/puits de tampon de saturation pendant 16 heures à température ambiante. Les plaques sont stockées avec le même tampon (300 µl/puits) à 4°C.

3) Fixation du tripode Y conforme à l'Invention (marqué à la fluorescéine) sur les plaques de microtitration

15 On prépare une gamme de dilution du tripode Y (marqué à la fluorescéine) synthétisé ci-dessus à l'exemple 4 en tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 en réalisant un premier point de gamme à une concentration de 0,5 µM puis 4 dilutions successives au tiers (soit 0,167 µM ; 0,055 µM ; 0,0185 µM et $6,2 \cdot 10^{-3}$ µM). On dépose 100 µl de chaque concentration en double dans des puits revêtus de

20 neutravidine ou pour lesquels on n'a effectué que l'étape de saturation (témoin négatif). Après une incubation sous agitation pendant 3 heures à température ambiante, on lave les plaques avec le tampon de lavage (5 fois) puis on dépose 100 µl de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4. La lecture de la plaque est effectuée avec un fluorimètre Analyst AD system (LJL Biosystem) permettant la lecture de

25 microplaques, à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et à une longueur d'onde d'émission de 530 nm qui sont les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission correspondant à la fluorescéine.

Résultats

30 Les courbes obtenues avec neutravidine (carré noir) et sans neutravidine (triangle noir : témoin) sont représentées sur la figure 2 annexée sur laquelle la fluorescence (en unités arbitraires) est exprimée en fonction de la concentration en tripode Y conforme à l'Invention (µM).

Ces résultats montrent une augmentation de la fluorescence proportionnelle à celle de la concentration en tripode conforme à l'Invention jusqu'à une concentration de 0,17 μ M puis un plateau correspondant à la saturation des sites de liaison de la neutravidine par le tripode. En absence de neutravidine immobilisée, aucune augmentation de la fluorescence n'est observée.

Dans les exemples qui suivent, le tripode Y de l'exemple sera utilisé à une concentration de 20 nM qui permet, au regard de ces résultats, d'obtenir un signal suffisant.

4) Saturation de la phase solide par le mAb SP31-TMR pour former un complexe C

On prépare une gamme de dilution du mAb SP31-TMR en tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 en réalisant un premier point de gamme à une concentration de 100 nM puis 6 dilutions au tiers. On dépose 100 μ l de chaque concentration en double avec 100 μ l d'une solution du tripode Y de l'exemple 4 (solution à 20 nM dans du tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4) dans les puits d'une microplaque. Après incubation pendant 16 heures à 4°C, on lave les microplaques à l'aide du tampon de lavage (5 fois), puis on dépose 100 μ l de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 et on mesure la fluorescence.

Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 3 annexées sur laquelle la fluorescence mesurée (en unités arbitraires) est exprimée en fonction de la concentration en mAb SP31-TMR (en nM).

Ces résultats montrent qu'à partir d'une concentration de 1 nM en anticorps, la fluorescence diminue proportionnellement à la concentration en mAb SP31-TMR, jusqu'à un maximum d'inhibition de 70 % obtenu à partir d'une concentration en mAb SP31-TMR de 33 nM. Ces résultats démontrent que :

i) l'anticorps se complexe au tripode Y conforme à l'Invention en reconnaissant l'épitope.

ii) la configuration du tripode Y conforme à l'Invention permet un transfert d'énergie par résonance de la fluorescéine à la TMR, qui se traduit par une diminution de la fluorescence de la fluorescéine.

5) Détection de la substance P sur support solide

On prépare une gamme de dilution de Substance P en tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 en réalisant un premier point de gamme à une

concentration de 200 nM puis 6 dilutions au tiers. On dépose ensuite 100 µl du tripode préparé à l'exemple 4 (20 nM) et 100 µl de mAb SP31-TMR (30 nM) (ou 100 µl de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 pour les puits témoins négatifs) dans chaque puits. Après une incubation de 5 heures à température ambiante sous agitation, les plaques sont lavées à l'aide du tampon de lavage (5 fois) puis on dépose 100 µl de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 et on mesure la fluorescence.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 4 annexée sur laquelle le pourcentage d'inhibition par la Substance P de la diminution de la fluorescence provoquée par le mAb SP31-TMR (% ID) est exprimé en fonction de la concentration en substance P (en nM).

Ce pourcentage d'inhibition est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\% ID = [(Fl_x - Fl_0)/(Fl - Fl_0)] \times 100$$

dans laquelle :

- Fl_x correspond à la fluorescence mesurée en présence de Substance P à la concentration x ;
- Fl correspond à la fluorescence mesurée en absence de mAb SP31-TMR et de Substance P ;
- Fl_0 correspond à la fluorescence mesurée en présence de mAb SP31-TMR et absence de Substance P.

Ces résultats montrent, comme attendu, que l'augmentation de la concentration en Substance P induit une augmentation de la fluorescence (correspondant à l'inhibition de la diminution) de la fluorescéine. On obtient ainsi une courbe standard dont la limite de détection en Substance P est d'environ 2 nM.

6) Test de régénération de la phase solide

On prépare trois dilutions de Substance P (respectivement 1 ; 0,1 et 0,01 µM) en tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4. On dépose ensuite 100 µl du tripode Y tel que préparé ci-dessus à l'exemple 4 (20 nM) et 100 µl de mAb SP31-TMR (50 nM) (ou 100 µl de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 pour les puits témoins négatifs : puits Fl_0) dans chaque puits. On utilise le mAb SP31-TMR à 50 nM afin de complexer tous les tripodes présents sur la phase solide. Après une incubation de 16 heures à 4°C, on lave les plaques à l'aide du tampon de lavage (5

fois) puis on dépose 100 μ l de chaque concentration de Substance P en triple (puits Fl_x). Les puits Fl et Fl_0 sont également réalisés en triple. Après une incubation de 5 heures à température ambiante sous agitation, on lave les plaques à l'aide du tampon de lavage (5 fois) puis on dépose 100 μ l de tapon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 et on mesure la fluorescence (premier dosage).

On lave à nouveau les plaques de la même façon que précédemment et on incube 100 μ l de mAb SP31-TMR (50 nM) (ou 100 μ l de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 pour les puits Fl) pendant 16 heures à 4°C. Les plaques sont à nouveau lavées (5 fois), puis on dépose 100 μ l de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 et on mesure la fluorescence (étape de régénération des plaques).

On lave de nouveau les plaques (5 fois) et on dépose soit 100 μ l de tampon phosphate de potassium pour les puits Fl et Fl_0 soit 100 μ l de Substance P (à 1 : 0,1 ou 0,01 μ M). Après une incubation de 5 heures à température ambiante sous agitation, on lave les plaques (5 fois), puis on dépose 100 μ l de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 et on mesure la fluorescence (deuxième dosage).

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 5 annexée sur laquelle la fluorescence (en unités arbitraires) mesurée pour les puits Fl , Fl_0 et Fl_x est exprimée pour les premier et deuxième dosages ainsi que pour la mesure faite après l'étape de régénération.

Ces résultats mettent en évidence que :

i) les différentes étapes du procédé de détection (dépôts, lavages), n'entraînent pas la dissociation du tripode Y conforme à l'Invention de la phase solide : la fluorescence mesurée dans les puits Fl est constante ;

ii) le dépôt du mAb SP31 permet une régénération homogène de la phase solide : mêmes valeurs de fluorescence pour tous les puits Fl_x et Fl_0 ;

iii) la régénération est totale : la fluorescence mesurée pour les puits Fl_x après l'étape de régénération est similaire à celle des puits Fl_0 effectuée au premier dosage ;

iv) cette étape de régénération est compatible avec un deuxième dosage effectué ultérieurement sur la même phase solide car on obtient les mêmes valeurs de fluorescence pour des concentrations en Substance P identiques.

7) Mise en évidence de la faisabilité de dosages répétés sur une même phase solide

On prépare trois dilutions de Substance P (1 ; 0,1 et 0,01 μM) en tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4.

5 i) On dépose 100 μl du tripode préparé ci-dessus à l'exemple 4 (20 nM) et 100 μl de mAb SP31-TMR (50 nM) ou 100 μl de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 (témoin négatif : puits Fl_0) dans chaque puits d'une microplaque. On utilise le mAb SP31-TMR à la concentration de 50 nM afin de complexer tous les tripodes présents sur la phase solide. Après une incubation de 16 heures à 4°C, on lave la microplaque à l'aide du tampon de lavage (5 fois) puis on
10 dépose 100 μl de chaque concentration de Substance P en triple. Les puits Fl et Fl_0 sont également réalisés en triple. Après une incubation de 5 heures à température ambiante sous agitation, on lave la microplaque (5 fois) puis on dépose 100 μl de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 et on mesure la fluorescence (premier dosage).

15 ii) On lave à nouveau la plaque (5 fois) et on incube 100 μl de mAb SP31-TMR (50 nM) (ou 100 μl de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 pour les puits Fl) pendant 16 heures à 4°C (étape de régénération).

iii) On lave à nouveau la plaque (5 fois) et on dépose soit 100 μl de tampon phosphate pour Fl et Fl_0 , soit 100 μl de Substance P (à 1 ; 0,1 ou 0,01 μM).
20 Après une incubation de 5 heures à température ambiante sous agitation, on lave la plaque (5 fois), puis on dépose 100 μl de tampon phosphate et on mesure la fluorescence (deuxième dosage).

Pour les dosages suivants, on répète les étapes ii) et iii) en faisant varier les puits dans lesquels sont déposés le tampon phosphate pour Fl_0 et les
25 différentes concentrations de Substance P.

On réalise ainsi 11 dosages successifs sur la même phase solide.

Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 6 et 7 annexées.

Sur la figure 6, la fluorescence (en unités arbitraires) correspond, pour chaque puits Fl , Fl_0 et Fl_x , à la moyenne des 11 dosages effectués. Sur la figure 7,
30 la fluorescence (en unités arbitraires) correspond aux valeurs obtenues pour chacun des 11 dosages effectués pour les puits Fl , Fl_0 et Fl_x avec $x = 1 \mu\text{M}$ de Substance P.

Ces résultats montrent que pour chaque concentration de Substance P, les valeurs de fluorescence sont homogènes et supérieures à celles obtenues en absence de Substance P. De plus, les fluctuations observées sont aléatoires ; il n'y a pas de baisse ou d'augmentation progressive de la fluorescence au fil des dosages.

5

Ces résultats montrent également que le procédé de détection conforme à la présente Invention permet le dosage répété d'un analyte sur une phase solide, chacun des puits (ou site de réaction) pouvant être régénéré de façon équivalente et permettre une nouvelle détection ultérieure.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection d'un analyte a dans un échantillon fluide, caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes suivantes :

5 1) la saturation d'un support solide comportant, sur au moins une partie de sa surface, au moins un réactif trifonctionnel (tripode Y) comportant les trois pôles fonctionnels suivant :

i) un groupement luminescent (L),

ii) une molécule (B) choisie parmi l'analyte a, un analogue de l'analyte a ou un fragment de l'analyte a; et

10 iii) une fonction assurant la fixation dudit réactif trifonctionnel sur la surface dudit support solide ;

par un récepteur de l'analyte a, ledit récepteur étant marqué par un composé accepteur (Q) (récepteur-Q) de la luminescence du groupement L, pour former un complexe C entre ladite molécule (B) et ledit récepteur-Q ;

15 2) la mise en contact du support solide obtenu à l'étape 1) avec un échantillon fluide susceptible de renfermer l'analyte a à détecter ;

3) la mesure de l'intensité du signal émis par le groupement L qui est proportionnelle à la quantité d'analyte a présent au sein de l'échantillon fluide ; et

20 4) la régénération du support solide par mise en contact dudit support solide avec du récepteur-Q.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que plusieurs types tripodes Y, différant les uns des autres par la nature de la molécule (B) qu'ils comprennent, sont fixés sur des zones distinctes et connues du support solide.

25 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait que les étapes 3) et 4) sont réalisées en continu.

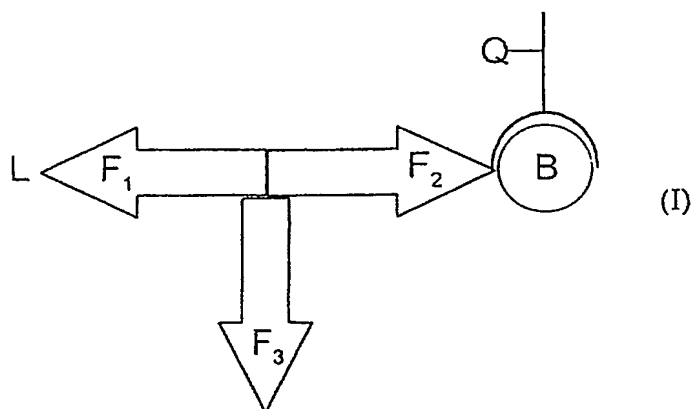
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le support solide est choisi parmi les verres, les plastiques, les céramiques, les métaux et les métalloïdes.

30 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le support se présente sous la forme de tube, de capillaire, de plaque ou de bille.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'échantillon fluide est constitué par de l'eau, un milieu biologique liquide ou un milieu liquide contenant des molécules gazeuses dissoutes ou provenant d'échantillons solides.

5 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'intensité du signal émis lors de l'étape 3) est effectuée par un détecteur de luminescence.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le complexe C formé à l'issue de l'étape 1) de saturation est
10 choisi parmi les complexes de formule (I) suivante :



dans laquelle :

- les flèches représentent la structure du squelette du tripode Y qui est un bras de liaison constitué par une chaîne peptidique, nucléotidique, glucosidique
15 ou par une chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ; lesdites chaînes étant éventuellement substituées, interrompues et/ou terminées par un ou plusieurs hétéroatomes tels que N, O ou S et/ou par un ou plusieurs acides aminés, et comportant trois fonctions chimiques réactives F_1 , F_2 et F_3 ;

- L représente un groupement luminescent lié de façon covalente au
20 tripode Y par l'intermédiaire de la fonction chimique réactive F_1 ;

- B représente un analyte a, un analogue structurel d'un analyte a ou un fragment d'un analyte a sur lequel est fixé, de façon non covalente et réversible, un récepteur spécifique de l'analyte a, ledit récepteur étant marqué par un composé Q ; la

molécule (B) étant liée de façon covalente au tripode Y par l'intermédiaire de la fonction chimique réactive F_2 ;

- Q représente un composé accepteur de la luminescence du groupement L ;

5 - F_3 représente une fonction chimique réactive apte à permettre la fixation du tripode Y sur la surface du support solide.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé par le fait que les fonctions F_1 , F_2 , F_3 , indépendamment l'une de l'autre, assurent :

i) soit une liaison directe *via* une fonction chimique correspondante
10 présente sur le composé luminescent, la molécule (B) ou la phase solide ;

ii) soit une liaison indirecte, et dans ce cas, la liaison est réalisée en couplant à l'une au moins des fonctions F_1 , F_2 et/ou F_3 , une molécule M_1 apte à former un complexe avec une molécule M_2 préalablement fixée sur au moins une partie de la surface de la phase solide, sur la molécule (B) et/ou sur le groupement luminescent.

15 10. Procédé selon la revendication 8 ou 9, caractérisé par le fait que les fonctions F_1 , F_2 et F_3 , identiques ou différentes, sont choisies parmi les fonctions thiols ; amines ; alcools ; acides ; esters ; isothiocyanates ; isocyanates ; acylazides ; chlorures de sulfonyl ; aldéhydes ; glyoxals ; époxydes ; oxiranes ; carbonates ; imidoesters ; carbodiimides ; maléimides ; nitriles, aziridines ; acryloyl ; les dérivés
20 halogénés ; les groupements disulfides ; phosphorés ; diazo ; carbonyldiimidazole ; hydrazides ; arylazides ; hydrazines ; diazirines ; magnésiens ; lithiens ; cuprates ; zinciques et les systèmes insaturés.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé par le fait que les fonctions F_1 , F_2 et F_3 sont choisies parmi les fonctions amines de formule $R-NH_2$,
25 $R-NH-$, $(R)_3-N$, $R-NH-OR$ et NH_2-OR ; les fonctions alcool $R-OH$; et les groupements halogénés de formule $R-X$ avec X représentant un atome d'halogène ; étant entendu que dans lesdites formules R représente un radical alkyle, aryle, vinyle, ou allyle.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes,
30 caractérisé par le fait que les groupements luminescents sont choisis parmi la fluorescéine (fluorescéinate de sodium) et ses dérivés ; la rhodamine et ses dérivés ; le diaminidophényl indo (DAPI) ; l'acridine ; les colorants fluorescents à amines

réactives ; les colorants fluorescents vendus sous les dénominations commerciales BODIPY® ; les colorants Cascade Blue, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, DABCYL® et EDANS® ; l'Eosine ; l'Erythrosine, le 6-Fam et le Texas Red.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que les récepteurs sont choisis parmi les anticorps sous forme entière, fragmentaire ou recombinante, les récepteurs biologiques, les acides nucléiques, les acides peptidonucléiques, les lectine, les protéines transporteuses, les chélates et les récepteurs synthétiques.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que ledit récepteur présente une plus grande affinité pour l'analyte a que pour la molécule (B).

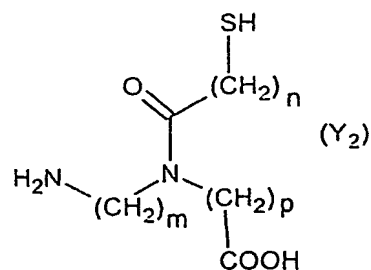
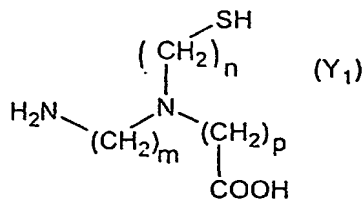
15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le composé accepteur (Q) est choisi parmi la rhodamine et ses dérivés, les composés fluorescents cités à la revendication 12, des molécules non-fluorescentes choisies parmi les composés vendus sous les dénominations commerciales Black Hole Quencher® 1, 2 et 3, Nanogold Particules®, Eclipse Dark Quencher®, Elle Quencher®, le vert de malachite, et les colorants QSY® 7, QSY® 9 et QSY® 21.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 15, caractérisé par le fait que les complexes de formule (I) sont choisis parmi les composés dans lesquels :

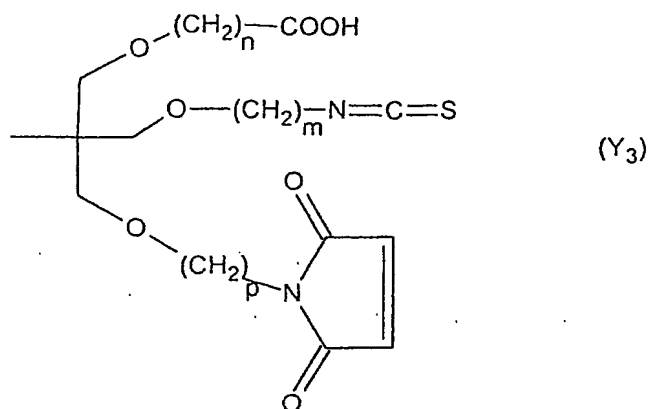
i) (B) est choisi parmi les peptides, les protéines, les oligonucléotides, les sucres et les acides peptidonucléiques,

ii) L est de la fluorescéine, et

25 iii) le squelette du tripode Y est choisi parmi les structures Y₁ à Y₃

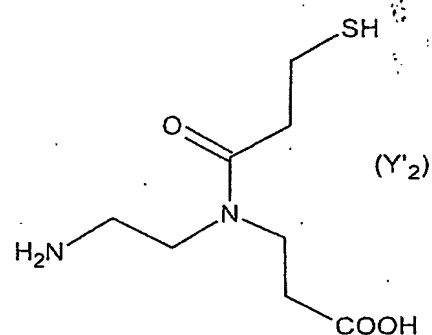
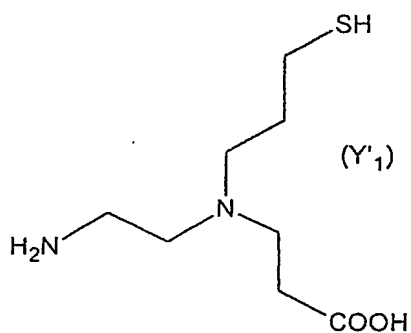


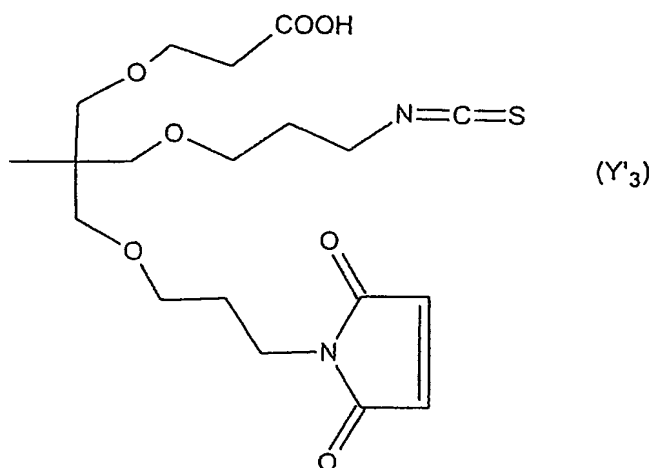
suivantes :



dans lesquelles n, m et p, identiques ou différents, sont des nombres entiers compris entre 1 et 20 inclusivement.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé par le fait que les structures Y₁ à Y₃ sont choisies parmi les composés de formules (Y'₁) à (Y'₃) suivantes :



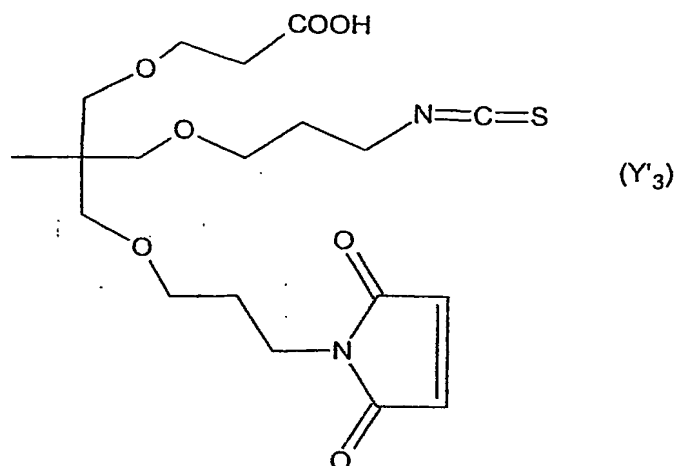


18. Complexes C de formule (I) tels que définis à l'une quelconque des revendications 8 à 17.

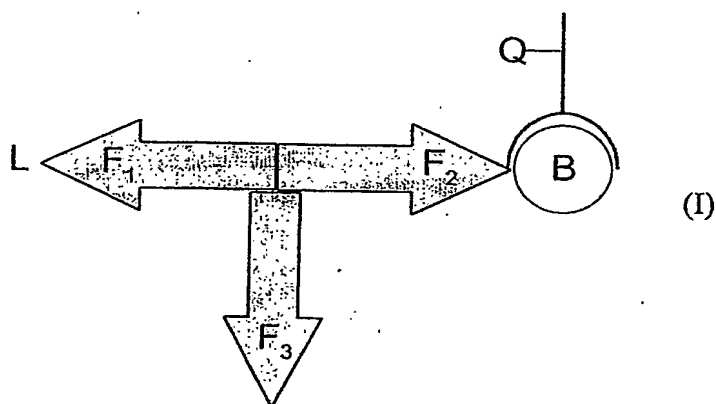
19. Utilisation d'au moins un complexe C de formule (I) tel que défini à l'une quelconque des revendications 8 à 16, dans un procédé de détection en continu en phase hétérogène d'un analyte a au sein d'un échantillon fluide.

20. Dispositif de détection en continu en phase hétérogène d'au moins un analyte a dans un échantillon fluide, ledit dispositif étant caractérisé par le fait qu'un échantillon fluide à analyser est intégré dans un milieu formant un flux s'écoulant sur au moins un support solide à la surface duquel est fixé au moins un tripode Y tel que défini à la revendication 1 et spécifique de l'analyte a à détecter, un détecteur de luminescence disposé en regard du support solide est couplé à une commande de vanne asservie à un seuil d'intensité de signal émis par le détecteur et qui déclenche, pendant une durée déterminée, l'ouverture d'un réservoir renfermant un récepteur-Q apte à former un complexe avec le tripode Y, ce réservoir étant relié au support par une boucle de rétroaction qui débouche en amont du support solide sur lequel est fixé le tripode Y, afin de saturer et/ou régénérer ce dernier en récepteur-Q par passage dans le flux et complexation sur le tripode Y.

21. Dispositif selon la revendication 20, dans lequel les valeurs de l'intensité de la luminescence sont monitorées et accessoirement traduites en quantité d'analyte a par un système de calcul couplé au détecteur de luminescence.



18. Complexes C caractérisés par le fait qu'ils répondent à la formule (I) suivante :



dans laquelle L, B, Q, les flèches et F_1 , F_2 et F_3 sont tels que définis à l'une quelconque des revendications 8 à 17.

19. Utilisation d'au moins un complexe C de formule (I) tel que défini à l'une quelconque des revendications 8 à 16, dans un procédé de détection en continu en phase hétérogène d'un analyte a au sein d'un échantillon fluide.

20. Dispositif de détection en continu en phase hétérogène d'au moins un analyte a dans un échantillon fluide, ledit dispositif étant caractérisé par le fait qu'un échantillon fluide à analyser est intégré dans un milieu formant un flux s'écoulant sur au moins un support solide à la surface duquel est fixé au moins un tripode Y tel que défini à la revendication 1 et spécifique de l'analyte a à détecter, un

22. Dispositif selon la revendication 20 ou 21, dans lequel un marqueur d'évènement est disposé dans la boucle de rétroaction afin de signaler une variation de l'intensité du signal supérieure à une valeur prédéterminée.

5 23. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 20 à 22, dans lequel le support solide est un capillaire couplé à l'environnement contenant l'échantillon à analyser, le couplage étant réalisé soit par l'intermédiaire d'un ballon de capture où l'échantillon barbote dans un milieu correspondant à celui du flux d'écoulement, soit par l'intermédiaire d'un conduit souple.

10 24. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 20 à 23, dans lequel le flux est entraîné par la dépression produite par une pompe, un piston, ou équivalent.

15 25. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 20 à 24, caractérisé par le fait qu'il est équipé d'un ballon de capture et d'un système de barbotage permettant de collecter des échantillons sous forme gazeuse et de solubiliser les constituants à détecter qu'ils renferment.

26. Utilisation d'un dispositif tel que défini à l'une quelconque des revendications 20 à 25, pour détecter la présence d'un analyte a dans un milieu naturel ou industriel.

20 27. Utilisation selon la revendication 26, caractérisé par le fait que le dispositif est utilisé en lacs, rivières, piscines, usines, stations d'épuration, systèmes de ventilation ou de climatisation.

détecteur de luminescence disposé en regard du support solide est couplé à une commande de vanne asservie à un seuil d'intensité de signal émis par le détecteur et qui déclenche, pendant une durée déterminée, l'ouverture d'un réservoir renfermant un récepteur-Q apte à former un complexe avec le tripode Y, ce réservoir étant relié au support par une boucle de rétroaction qui débouche en amont du support solide sur lequel est fixé le tripode Y, afin de saturer et/ou régénérer ce dernier en récepteur-Q par passage dans le flux et complexation sur le tripode Y.

21. Dispositif selon la revendication 20, dans lequel les valeurs de l'intensité de la luminescence sont monitorées et accessoirement traduites en quantité d'analyte a par un système de calcul couplé au détecteur de luminescence.

22. Dispositif selon la revendication 20 ou 21, dans lequel un marqueur d'évènement est disposé dans la boucle de rétroaction afin de signaler une variation de l'intensité du signal supérieure à une valeur prédéterminée.

23. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 20 à 22, dans lequel le support solide est un capillaire couplé à l'environnement contenant l'échantillon à analyser, le couplage étant réalisé soit par l'intermédiaire d'un ballon de capture où l'échantillon barbote dans un milieu correspondant à celui du flux d'écoulement, soit par l'intermédiaire d'un conduit souple.

24. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 20 à 23, dans lequel le flux est entraîné par la dépression produite par une pompe, un piston, ou équivalent.

25. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 20 à 24, caractérisé par le fait qu'il est équipé d'un ballon de capture et d'un système de barbotage permettant de collecter des échantillons sous forme gazeuse et de solubiliser les constituants à détecter qu'ils renferment.

26. Utilisation d'un dispositif tel que défini à l'une quelconque des revendications 20 à 25, pour détecter la présence d'un analyte a dans un milieu naturel ou industriel.

27. Utilisation selon la revendication 26, caractérisé par le fait que le dispositif est utilisé en lacs, rivières, piscines, usines, stations d'épuration, systèmes de ventilation ou de climatisation.

1/4

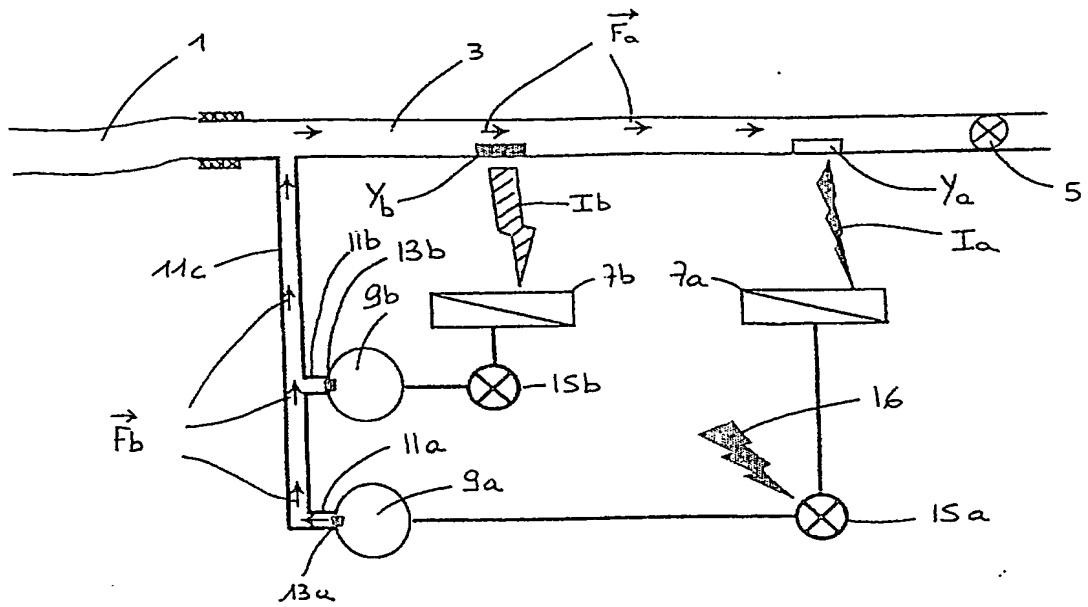


FIGURE 1

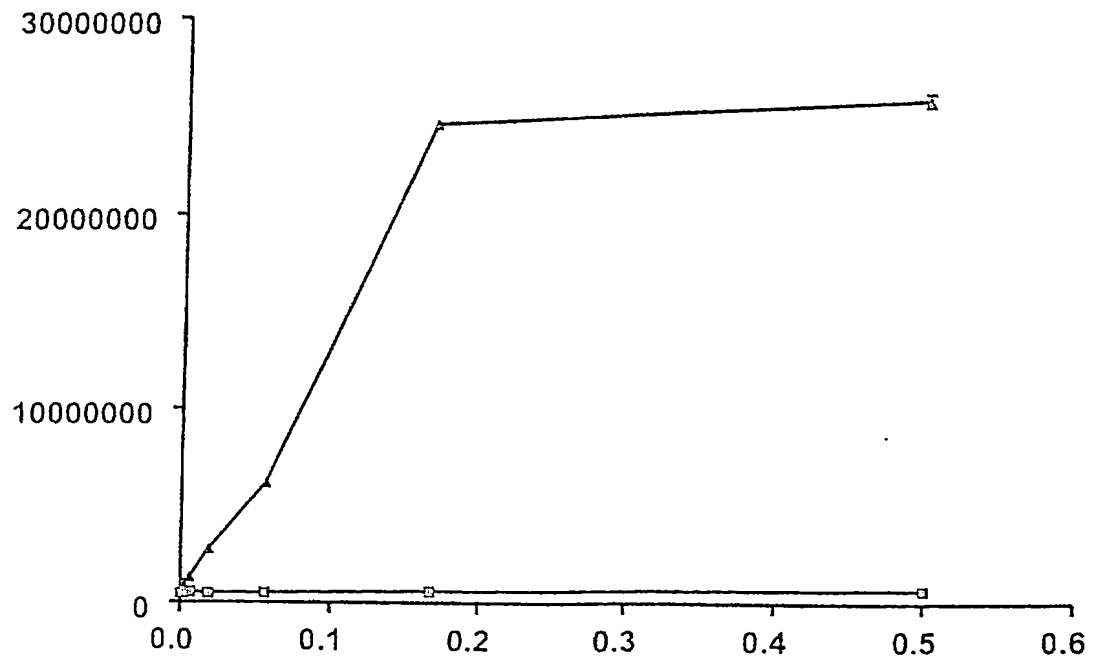
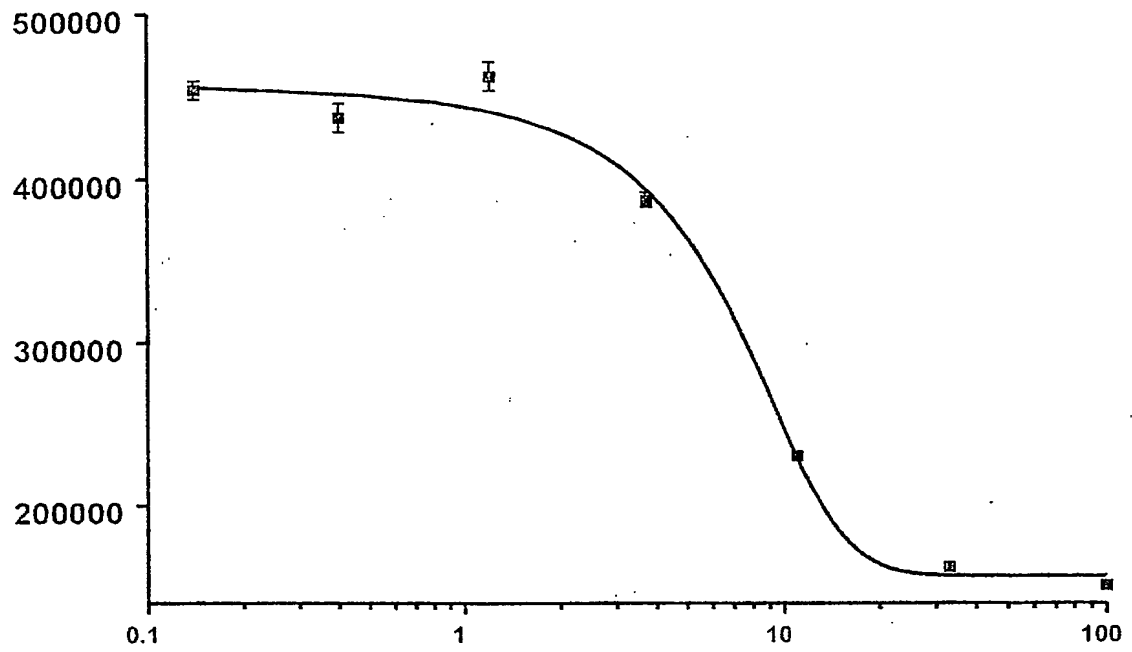
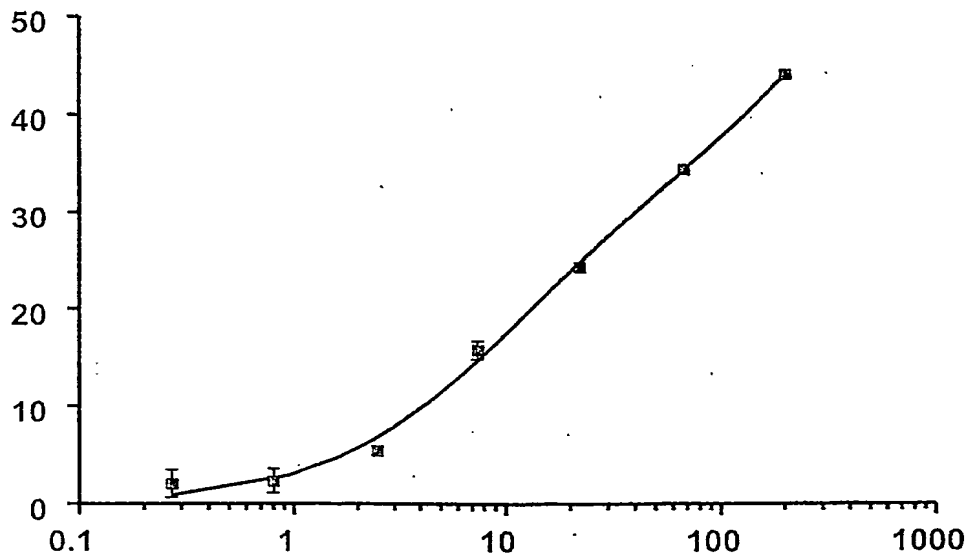
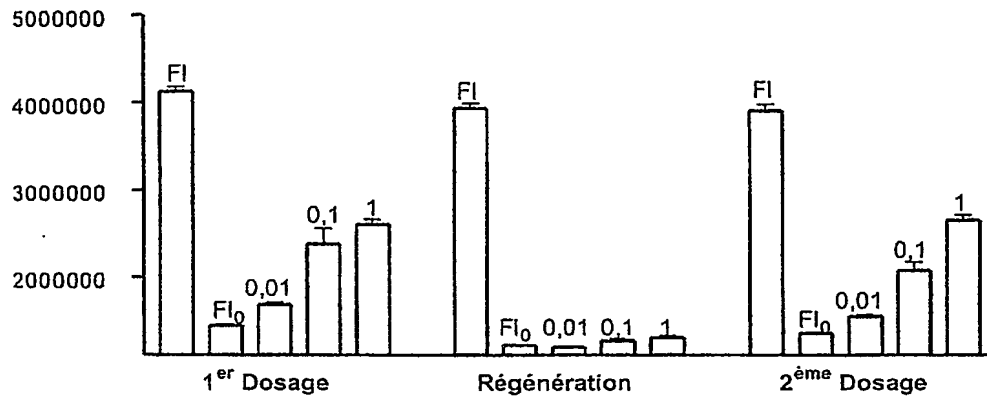
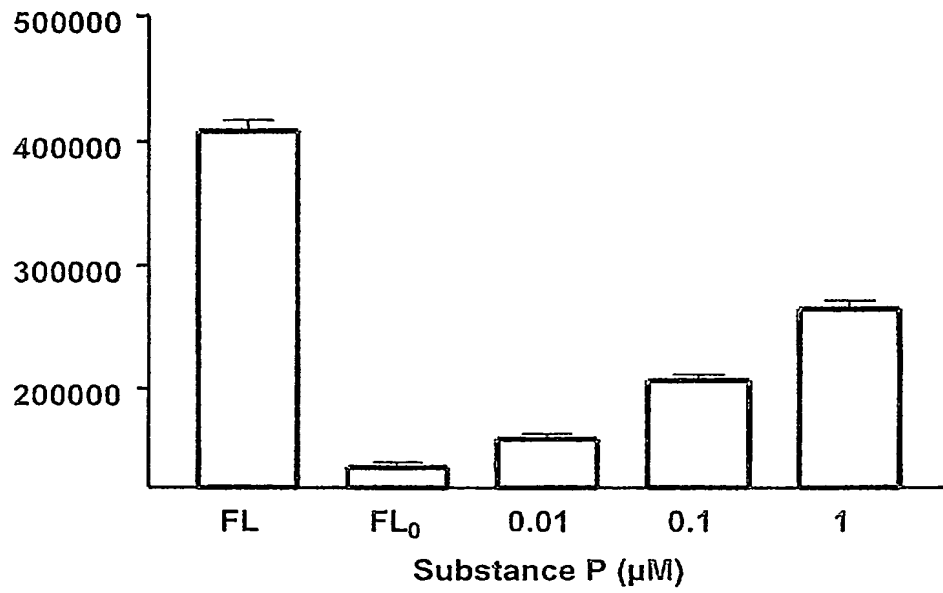
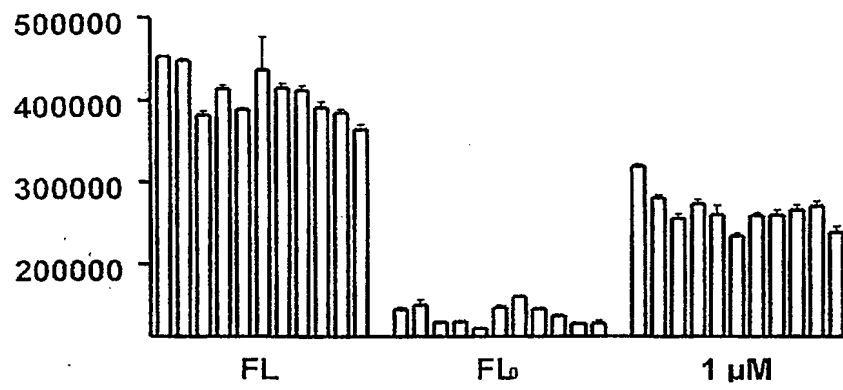


FIGURE 2

FIGURE 3FIGURE 4

FIGURE 5FIGURE 6

FIGURE 7

F263S86.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

<120> PROCEDE DE DETECTION EN CONTINU D'UN ANALYTE; REACTIF TRIFONCTIONNEL DE
DETECTION MIS EN OEUVRE ET DISPOSITIF DE DETECTION

<130> F263FR86

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<400> 1

Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met
1 5 10

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> lysine biotinylée

<400> 2

Lys Ser Ser Lys Arg Pro Ala Pro Gln Gln Phe Phe Gly Ala Met
1 5 10 15

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

INV

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

09 113 16 47 / 270501

Vos références pour ce dossier (facultatif)		SGimF263/86 FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02149/9
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
PROCÉDÉ DE DÉTECTION EN CONTINU D'UN ANALYTE, RÉACTIF TRIFONCTIONNEL DE DÉTECTION MIS EN ŒUVRE ET DISPOSITIF DE DÉTECTION.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31-33 rue de la Fédération 75015 PARIS		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	VOLLAND
	Prénoms	Hervé
	Adresse	Rue
		25, boulevard Dubreuil
		Code postal et ville
		[9 1 4 0 0] Orsay
	Société d'appartenance (facultatif)	
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	CREMINON
	Prénoms	Christophe
	Adresse	Rue
		30, avenue Saint Laurent, Bâtiment C2
		Code postal et ville
		[9 1 4 0 0] Orsay
	Société d'appartenance (facultatif)	
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	NEUBURGER
	Prénoms	Laure-Marie
	Adresse	Rue
		61, avenue Henri Ginoux
		Code postal et ville
		[9 2 1 2 0] Montrouge
	Société d'appartenance (facultatif)	
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Sophie GOULARD N°02-0503		

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

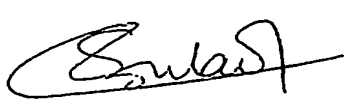
DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

CS 113 5 W / 27CE01

Vos références pour ce dossier (facultatif)		SGimF263/86 FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02/14959
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCÉDÉ DE DÉTECTION EN CONTINU D'UN ANALYTE, RÉACTIF TRIFONCTIONNEL DE DÉTECTION MIS EN ŒUVRE ET DISPOSITIF DE DÉTECTION.		
LE(S) DEMANDEUR(S) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31-33 rue de la Fédération 75015 PARIS		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/> Nom	GRASSI	
Prénoms	Jacques	
Adresse	Rue	28, avenue des Tilleuls
	Code postal et ville	9 1 4 4 0 Bures sur Yvette
Société d'appartenance (facultatif)		
<input type="checkbox"/> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
<input type="checkbox"/> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Sophie GOULARD N°02-0503 		

PCT Application
PCT/FR2003/003521

